



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ MIKROEXTRAKČNÍCH TECHNIK V
ANALÝZE BIOLOGICKÝCH VZORKŮ**

APPLICATION OF MICROEXTRACTION TECHNIQUES FOR ANALYSIS OF BIOLOGICAL SAMPLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martin Lučaj

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1207/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Martin Lučaj**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Využití mikroextrakčních technik v analýze biologických vzorků

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše shrnující využití mikroextrakčních technik pro analýzu biologických vzorků.
- Otestování vhodných separačních systémů v kapilární elektroforéze a získání vybraných analytických parametrů pro stanovení léčiv v biologických vzorcích.
- Otestování spojení mikroextrakcí přes kapalnou membránu na pevném nosiči s kapilární elektroforézou pro přímé analýzy biologických vzorků s komplexními maticemi.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Martin Lučaj
student(ka)

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá analýzou bázičkých liečiv v biologických vzorkách, ktorá kombinuje in-line prepojenie extrakcií cez kvapalnú membránu na pevnom nosiči (SLM) s kapilárnou elektroforézou (CE). Pre dosiahnutie lepších detekčných limitov bolo použité on-line zakoncentrovanie nadávkovaného vzorku pomocí transientnej isotachoforézy (tITP), kde bol ako tITP stacker použitý octan amónny a ako základný CE elektrolyt kyselina octová. Praktická časť bakalárskej práce sa sústreďuje na optimalizáciu podmienok tITP a mikroextrakcie cez SLM pre analýzu bázičkých liečiv v komplexných biologických vzorkách (ľudský moč). Najlepších analytických výsledkov bolo v tITP dosiahnutých pri hydrodynamickom dávkovaní octanu amónneho 15 s a bázičkých liečiv 15 s. Pri SLM extrakcii bol donor zalkalizovaný 10mM hydroxidom sodným a akceptor bol okyslený 10mM kyselinou chlorovodíkovou. Z výsledkov vyplýva, že in-line prepojenie SLM extrakcie a CE v kombinácii s tITP umožňuje priamu analýzu biologických vzoriek a zlepšenie citlivosti analytickej metódy.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the analysis of basic drugs in biological samples by in-line coupling of supported liquid membrane (SLM) to capillary electrophoresis (CE). The tITP method was included as an on-line preconcentration step to achieve better detection limits with ammonium acetate as the tITP stacker and acetic acid as the CE background electrolyte. The practical part of the thesis focuses on the optimization of the tITP and the SLM extraction conditions in the analysis of basic drugs in complex biological samples (human urine). The best analytical results were achieved with hydrodynamic injection of ammonium acetate for 15 s and basic drugs for 15 s. The donor was alkalisied with 10 mM sodium hydroxide and acceptor was acidified with 10 mM hydrochloric acid. From the results, the in-line coupling of SLM extraction to CE and stacking by tITP is an efficient method allowing direct analysis of complex samples with improved sensitivity of the analytical method.

KEUČOVÉ SLOVÁ

Kapilárna elektroforéza, kvapalná membrána na pevnom nosiči, zaostrenie, bázičné liečivá, biologické vzorky, mikroextrakcia,

KEY WORDS

Capillary electrophoresis, supported liquid membrane, stacking, basic drugs, biological samples, mikroextraction

LUČAJ, Martin. *Využití mikroextrakčních technik v analýze biologických vzorků*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/108414>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloš Dvořák.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

podpis študenta

Podakovanie

Touto cestou by som rád poďakoval Ing. Milošovi Dvořákovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, užitočné rady, trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval počas mojej bakalárskej práce. Taktiež moje poďakovanie patrí aj RNDr. Pavlovi Kubáňovi, Ph.D., DSc. za príležitosť podieľať sa na vedeckej činnosti na oddelení elektromigračných metód na Ústave analytickej chémie Akadémie vied ČR, v.v.i a za poskytnutie cenných rád. Ďakujem aj pani RNDr. Márii Veselej, Ph.D. za užitočné rady a odborné konzultanstvo. Ďalej moje poďakovanie patrí Ing. Lenke Ryšavej za obetavú pomoc a odborné vedenie pri praktickej časti bakalárskej práce. V neposlednej rade patrí jedno veľké ďakujem mojej rodine za poskytnutie finančného zázemia, prejavu dôvery a trpezlivosti pri štúdiu.

Obsah

1 Extrakčné techniky	7
2 Mikroextrakčné techniky	7
2.1 Mikroextrakčné techniky založené na sorbente	7
2.1.1 Mikroextrakcia v systéme kvapalina-tuhá fáza (SPME)	7
2.1.2 Mikroextrakcia tuhou fázou s použitím striekačky (MEPS)	8
2.2 Mikroextrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (LLME)	8
2.2.1 Mikroextrakcia na jednej kvapke (SDME)	9
2.2.2 Mikroextrakcie s využitím dutého vlákna (HF-LPME)	9
2.2.3 Extrakcia cez kvapalnú membránu na pevnom nosiči (SLM)	9
3 Elektromigračné separačné metódy	11
3.1 Kapilárna elektroforéza (CE)	11
3.1.1 Kapilárna zónová elektroforéza (CZE)	13
4 Prepojenie CZE s SLM	13
5 On-line prekoncentračné techniky	14
5.1 Normal stacking mode (NSM)	15
5.2 Large volume sample stacking (LVSS)	16
5.3 Transient isotachopheresis (tITP)	16
5.4 Dynamic pH junction	16
5.5 Sweeping	17
5.6 Field amplified sample stacking (FASS)	17
5.7 Vlastnosti vybraných analytov	17
5.8 Validačné parametre	18
5.8.1 Limit detekcie a limit kvantifikácie	18
5.8.2 Rozlíšenie	18
5.8.3 Signál šum	18
6 Experimentálna časť	19
6.1 Používané prístroje a roztoky	19
6.1.1 Zásobné roztoky	19
6.1.2 Príprava základného elektrolytu	19
6.1.3 Rostoky používané pre mikroextrakcie	20
6.1.4 Reálne vzorky	20
6.2 Príprava mikroextrakčnej jednotky	20

6.3	Nastavenie tITP	21
7	Výsledky a diskusia	21
7.1	Optimalizácia separácie	21
7.1.1	Voľba BGE	21
7.1.2	Optimalizácia separačného napätia (bez zaostrovacej zóny octanu amónneho).....	21
7.1.3	Optimalizácia separačného napätia (so zaostrovacou zónou octanom amónnym)	22
7.1.4	Optimalizácia koncentrácie zóny octanu amónneho.....	23
7.1.5	Optimalizácia hydrodynamického dávkovania zóny octanu amónneho.....	24
7.1.6	Optimalizácia hydrodynamického dávkovania vzoriek.....	25
7.2	Stanovenie kalibračnej závislosti a medze detekcie CE metódy	26
7.3	Časové priebehy mikroextrakcie cez SLM	27
7.4	Časový priebeh mikroextrakcie reálnych vzoriek (moč)	28
7.5	Validácia parametrov optimalizovaných podmienok mikroextrakcie	29
8	Záver.....	31
9	Použitá literatúra.....	32
10	Zoznam použitých symbolov a skratiek	36

1 Extrakčné techniky

Extrakčné techniky patria medzi najznámejšie metódy izolácie analytov. Princíp extrakčných techník je založený na využití rozdielnych rozpustností jednotlivých zložiek vzorku v rozpúšťadlách. Dochádza k prechodu zložky zmesi fázovým rozhraním jednej fázy (plynnej, kvapalnej, pevnej) do druhej fázy (kvapalnej, pevnej) [1–4]. Prakticky sa jedná o absorpciu, alebo adsorpciu. Extrakčné techniky sú považované ako kľúčový krok k príprave vzorku a k jeho nasledujúcej analýze. Ich použitie nastáva vtedy, keď potrebujeme izolovať potrebný analyt, ktorý chceme analyzovať bez prítomnosti rušivých matric, ktoré by mohli ovplyvniť, alebo úplne skresliť výsledky. Využívajú sa aj vtedy, ak koncentrácia analytu vo vzorke je nižšia ako je citlivosť daného analytického systému. Ich úlohou je previesť daný analyt do extrakčného činidla tak, aby neboli zmenené jeho fyzikálno-chemické vlastnosti. Medzi najpoužívannejšie extrakčné techniky, ktoré pre prípravu vzoriek využívajú extrakciu rozpúšťadlami patrí napríklad ultrazvuk, extrakcia Soxhletom, extrakcia kvapalina-kvapalinou a iné. Doposiaľ bola publikovaná celá rada prác, ktoré sa zaoberajú rôznymi extrakčnými technikami [1–4]. Nevýhodou je ich časová náročnosť a predovšetkým použitia veľkého množstva organických rozpúšťadiel. V poslednom období je snaha o vytvorenie nových extrakčných postupov, ktoré by nepoužívali tak veľké množstvo organických rozpúšťadiel a boli by šetrnejšie k životnému prostrediu [1, 5–6].

2 Mikroextrakčné techniky

Miniaturizácia extrakčných techník prispieva k zníženiu spotreby organických rozpúšťadiel a tým zmiernuje ich dopad na životné prostredie. Miniaturizácia extrakcií zabezpečilo tiež menšiu finančnú náročnosť, zlepšenie výkonnosti, ako napríklad vyššie výťažnosti, rýchlejší priebeh extrakcie a iné. Vo všeobecnosti sa tieto techniky uplatnili hlavne v príprave biologických vzoriek, skoncentrovaní veľmi malých koncentrácií analytov a k ich následnej analýze. Ďalším faktorom poháňajúcim rozvoj týchto techník je snaha o zníženie náročnosti analytického a aj extrakčného procesu. Zahrňuje viacero krokov, ako izoláciu a následné prečistenie extraktu do jediného kroku. V neposlednej rade k vývoju mikroextrakčných techník prispela aj snaha o spojenie extrakcie a prenosného analyzátora, ktorý by previedol izoláciu a následnú analýzu daných zlúčenín priamo v teréne [6–7].

2.1 Mikroextrakčné techniky založené na sorbente

2.1.1 Mikroextrakcia v systéme kvapalina-tuhá fáza (SPME)

Pôvodne bola SPME navrhnutá pre prípravu komplexnejších vzoriek pred analýzou pomocou plynovej chromatografie (GC). U SPME techniky je sorbent upevnený na nosiči (nerezový piest), ktorý sa spolu s vláknom zatláča do ochranného obalu. Následne sa vlákno vysunie z ochranného obalu a vloží sa do vzorky, tak aby sorbent bol v kontakte so vzorkou. Pri sorpcii sa vlákno ponára do roztoku s analytmi a prebieha statická alebo dynamická sorpcia analytu

na povrchu vlákna. Vytiahnuté vlákno sa zasunie po uplynutí expozičného času späť do ochranného obalu. Proces SPME rozdeľujeme na dve fázy. Prvá fáza zahŕňa adsorpciu analytu na povrchu SPME. Druhá fáza je založená na desorpcii analytu z povrchu vlákna do kolóny chromatografu. Využíva sa ako rýchla bezrozpúšťadlová alternatíva namiesto extrakcie analytu z kvapalnej vzorky. Ak je vlákno umiestnené nad vzorkou hovoríme o SPME v tzv. headspace usporiadaní. Kremenné vlákno býva pokryté filmom z materiálov ako sú napríklad polydimetylsiloxán, polyakrylát, alebo kopolymér divinylbenzénu spolu s dimetylsiloxánom. Ako nosný materiál sa dajú použiť niektoré kovy, prípadne ich zliatiny, čo v konečnom dôsledku zabezpečuje vyššiu stabilitu systému. Ďalšou variantou SPME môže byť kapilárna mikroextrakcia (CME). Je to metóda, ktorá sa využíva k zakoncentrovaniu analytu. Je vhodná pre analýzu polárnych a nepolárnych organických látok, ktoré sú obsiahnuté v rôznych matriciach. Sorpčná kapacita je obmedzená hrúbkou stacionárnej fázy a vrstvy vlákna. Čím hrubšia vrstva tým je výťažnosť daného analytu väčšia. Hrubšia vrstva vlákna sa uprednostňuje na zadržanie rýchlo prechádzajúcich látok a vlákno s tenšou vrstvou zabezpečuje rýchlejší priebeh difúzie a následné uvoľnenie látok s vysokým bodom varu počas priebehu tepelnej desorpcie. SPME technika dosiahla širokého uplatnenia pri čistení a preconcentracii vzorky od jej uvedenia Arthurom a Pawliszynem v roku 1990 [7–8]. Je jednoduchá na zostrojenie a odber a príprava vzorky je zlúčená do jedného kroku. Výhodou tejto techniky je jej rýchli priebeh a jednoduchosť, spotreba minimálneho množstva vzorky a práce bez pomoci rozpúšťadla. Nevýhodou metódy je cena kremenných vlákien a obmedzená životnosť SPME jednotiek a nižšia sorpčná kapacita vlákna. SPME sa využíva často v praxi na izoláciu stopových množstiev analytov z biologických vzoriek, v toxikológii, farmácii, kriminalistike [6–7, 9].

2.1.2 Mikroextrakcia tuhou fázou s použitím striekačky (MEPS)

Táto technika bola vyvinutá firmou AstraZeneca vo Švédsku 2004 [10]. MEPS je charakteristická používaním malého množstva sorbentu (1–2 mg), ktorý je umiestnený a utesnený v striekačke o objeme 100–250 µl, následne je do striekačky nasatá vzorka. Vzorka spolu so sorbentom prichádza prvýkrát do kontaktu pri nasatí vzorky. Následne prichádza vzorka-sorbent do styku druhýkrát pri vytlačení vzorky z priestoru striekačky. Zachytené analyty sú vymyté vhodným rozpúšťadlom a aplikujú sa do analytického prístroja, kde sa analyzujú. Medzi najbežnejšie používané sorbenty patrí silikagel, uhlík a mnoho ďalších. Výhodou tejto techniky je, že sorbent vydrží niekoľko za sebou idúcich extrakcií bez výrazného zníženia účinnosti [6, 11].

2.2 Mikroextrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (LLME)

LLME metóda vychádza z pôvodnej extrakčnej techniky kvapalina-kvapalina (LLE), ale oproti LLE používa výrazne menší objem extrakčného činidla. Výber správneho zloženia kvapalnej fázy (napríklad polarita organického rozpúšťadla) a donorovej a akceptorovej fázy (zloženie,

iónová sila, hodnota pH) je veľmi dôležitý pri účinnom prenose analytov z donorového do akceptorového roztoku. LLME je technika, ktorá je založená na prechode analytu medzi dvoma nemiešateľnými kvapalinami. Táto technika má rôzne variácie. Medzi najpoužívanejšie patria napríklad mikroextrakcia na jednej kvapke (SDME), mikroextrakcia s využitím dutého vlákna (HF-LPME), extrakcia cez kvapalnú membránu na pevnom nosiči (SLM), extrakcia s využitím tuhnúcej plávajúcej organickej kvapky (SFOD-ME), alebo disperzná mikroextrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (DLLME) [6, 9].

2.2.1 Mikroextrakcia na jednej kvapke (SDME)

SMDE techniku vyvinuli v roku 1996 Jeannot a Cantwell [12]. Táto technika sa využíva hlavne pri extrakciách analytov z roztoku vzorky do jedinej kvapky akceptorovej fáze. Po extrakcii je kvapka uzavretá a dávkovaná do analytického systému. SDME technika môže byť dvojfázová alebo trojfázová, záleží na počte fáz, ktoré sa podieľajú na priebehu extrakcií. Dvojfázová SDME je najobvyklejšia. V tomto usporiadaní sú analyty extrahované z vodnej vzorky do organickej fázy. V trojfázovej SDME sú analyty distribuované medzi donorovou fázou, organickou fázou a akceptorovou fázou [12, 13].

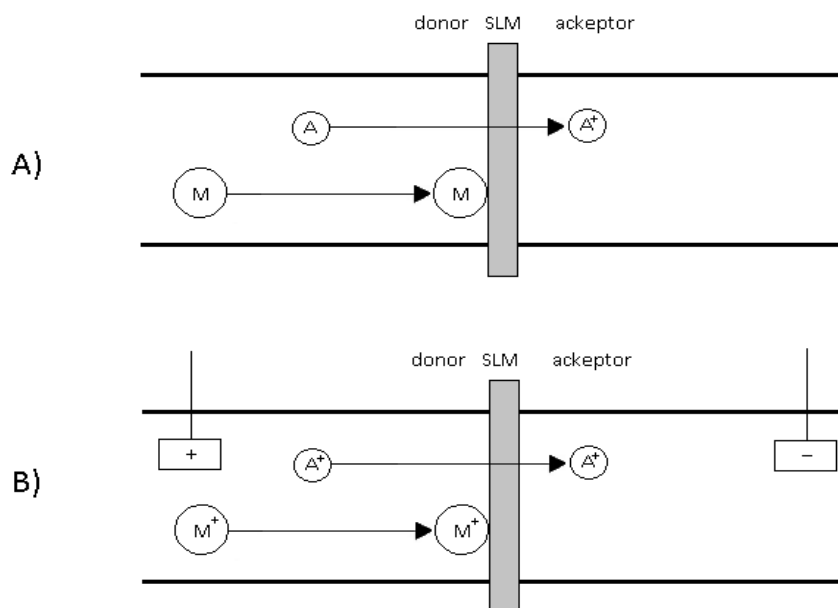
2.2.2 Mikroextrakcie s využitím dutého vlákna (HF-LPME)

HF-LPME je technika, pri ktorej sú stanovované látky extrahované cez kvapalnú membránu na pevnom nosiči (SLM), kde je organické rozpúšťadlo naviazané do jej polymérnej štruktúry. Do akceptorového roztoku, ktorý sa nachádza v dutom vlákne, prechádzajú už len samotné analyty bez nadbytočnej matrice. HF-LPME oproti SPME a SDME má výrazne lepšiu prečistovaciu účinnosť, čo rozširuje jej možnosti použitia. HF-LPME delíme na dvojfázové a trojfázové usporiadanie podľa počtu použitých fáz. Spoločným znakom pre obidve usporiadania je, že kvapalná membrána je umiestnená v póroch steny vlákna. V dvojfázovom usporiadaní je vlákno vkladané do roztoku donorovej fázy (donorový roztok obsahuje látky, ktoré chceme analyzovať tzv. darca) naplnený organickým roztokom (rovnaká ako v SLM). Výhoda tohto usporiadania spočíva v tom, že akceptorová fáza nie je priamo v kontakte s roztokom vzorky, čím sa zabráni stratám rozpúšťadla, ktoré boli časté u SDME. Trojfázové usporiadanie sa líši v zavedení vodnej akceptorovej fázy do dutého vlákna namiesto organického rozpúšťadla. Následne je (vodná) akceptorová fáza aplikovaná do analytického systému [14].

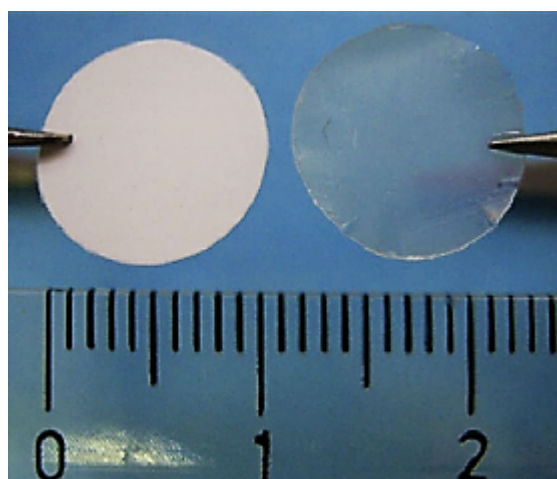
2.2.3 Extrakcia cez kvapalnú membránu na pevnom nosiči (SLM)

Termín SLM sa používa pre označenie tenkého, inertného polymerného materiálu membrány (zvyčajne z polypropylénu (PP), polytetrafluoretylénu (PTFE) atď.). Hrúbka pórov membrány je od 100–300 µm a pórovitosť dosahuje 30 až 70 %. Materiál membrány je naimpregnovaný vhodným organickým rozpúšťadlom, ktoré nie je rozpustné vo vode. Organické rozpúšťadlo sa pomocou kapilárnych síl drží v póroch hydrofóbnej membrány.

Membrána sa vkladá medzi dva vodné roztoky ako selektívna membrána, ktorá zabráňuje vzájomnému premiešaniu akceptorovej a donorovej fázy. Taktiež zabráňuje spätnému prechodu iónov z akceptorovej fázy do donorovej fázy, záleží na podmienkach ustanovujúcej sa rovnováhy. Donorový roztok obsahuje látky, ktoré chceme analyzovať a je umiestnený na jednej strane SLM membrány. Na druhej strane SLM membrány je umiestnený akceptorový roztok, do ktorého prechádzajú látky, ktoré chceme analyzovať bez prebytočnej matrice a takto extrahovaný roztok je pripravený na ďalšiu analýzu. Extrakcia cez SLM prebieha na základe difúzie (viď na obr. 1-A), alebo môže byť prenos analytov vyvolaný aj elektrickým polom (obr. 1-B). Pre difúzne procesy platí, že analyty sú vo vodnom donorovom roztoku neutrálne a prechádzajú do organickej fázy SLM membrány ako neutrálne častice. Na druhej strane SLM membrány sú uvoľňované v iónovom stave do akceptorového roztoku (obr. 1-A). Prestup analytov z donorovej fázy do akceptorovej fázy výrazne podporuje pH gradient. V prípade elektricky indukovaného prenosu cez SLM sú analyty v akceptore aj donore ionizované. Objem donorového roztoku je väčšinou výrazne väčší oproti akceptorovému roztoku, ale nie je to podmienka. Akceptorový roztok spolu s analytmi môže byť analyzovaný analytickým systémom. Prvé experimenty s SLM membránami začali v 70 rokoch minulého storočia, kedy sa využívali v chemickom priemysle hlavne na separáciu malých kovových iónov v syntetických zmesiach [15]. Ich potenciál v analytickej chémii nebol vtedy známy. Až v 80 rokoch sa začala SLM technika spájať s rôznymi separačnými technikami pre analýzu zložitejších vzoriek [16]. Ako organické rozpúšťadla sa vyberajú látky také, aby boli hydrofóbne a dostatočne viskózne. Táto podmienka je ľahko dosiahnuteľná pomocou nepolárnych látok, ktoré vytvoria membránové rozhranie a môže byť používané priebežne aj niekoľko týždňov bez výraznej zmeny fyzikálno-chemických vlastností. Spotreba organických rozpúšťadiel pri tejto technike je veľmi malá (zvyčajne do desiatok μL). Táto technika je zaraďovaná medzi tzv. zelené extrakčné techniky kvôli jej nízkej spotrebe organických rozpúšťadiel a cenovej dostupnosti. Technika je atraktívna kvôli jednoduchej úprave biologických vzoriek ako napríklad ľudskej plazmy, alebo moču. Pri pracovaní s touto metódou je dôležité dbať na hrúbku použitej membrány, pretože čím je membrána hrubšia, tým väčšia je spotreba organického rozpúšťadla umiestneného v póroch membrány a to má za následok dlhší extrakčný čas. Na druhej strane ani extrémne tenká membrána nie je príliš vhodné riešenie, pretože s extrémne tenkými membránami sa obtiažne manipuluje a nie sú príliš stabilné. V praxi sa väčšinou pracuje so 100 μm hrúbkou, s ktorou sa ľahko manipuluje a zabezpečuje vysokú výťažnosť a efektívnosť. SLM extrakcia bola v minulosti veľmi často využívaná aj v priemysle pri priemyselných separáciách [16–20]. Napríklad pri extrakcii kovových iónov, alebo organických kyselín z odpadných vôd [21–22].



Obr. 1 A) Princíp difúzneho prenosu látok cez SLM, B) Princíp elektricky indukovaného prenosu látok cez SLM [17].



Obr. 2: Nenaimpregnovaná membrána (v ľavo), naimpregnovaná membrána (v pravo)[17].

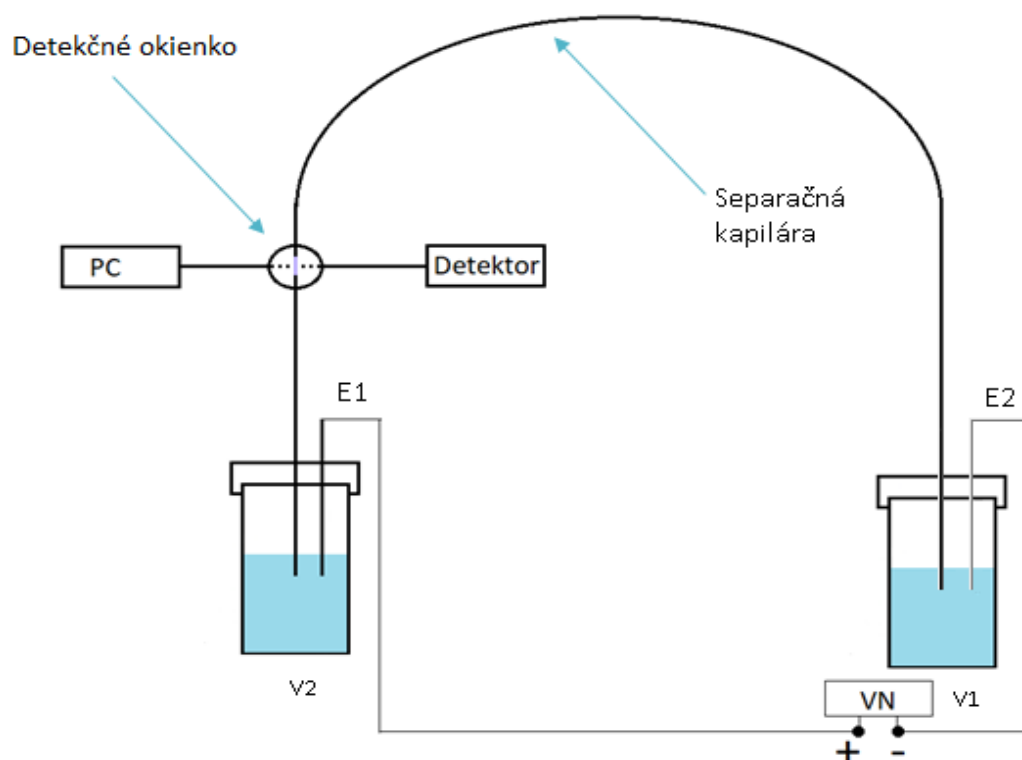
3 Elektromigračné separačné metódy

Elektromigračné separačné metódy sú užitočným nástrojom analytickej chémie, ktoré sú určené k deleniu nabitých častíc vplyvom elektrického pola. Elektroforéza ako separačná metóda bola zaradená do analytickej praxe v 30. rokoch 20. storočia (Tiselius, 1937) [23]. Častice s kladným nábojom (katióny) sa v elektrickom poli pohybujú smerom k negatívne nabitej elektróde (katóde) a častice s negatívnym nábojom sa pohybujú opačným smerom, teda ku kladne nabitej elektróde (anóde). V súčasnosti túto tému popisuje množstvo prác [6, 24–26].

3.1 Kapilárna elektroforéza (CE)

Základnou požiadavkou CE je prítomnosť základného elektrolytu (BGE), alebo gélu v separačnej kapiláre (Hjerten, 1967) [27]. Obidva konce kapiláry sú ponorené do zásobného

roztoku BGE spoločne s elektródami, ktoré sú vyrobené z inertného materiálu (Pt, Pt/Ir a iné). CE systém sa okrem separačnej kapiláry skladá taktiež z vysokonapäťového napájacieho zdroja (bežne používané napätie 0–30 kV), separačnej kapiláry (vyrobenej z taveného kremeňa, obvyklý vnútorný priemer: 10–100 μm , dĺžka: 30–100 cm), dvoch nádob (vialok) s BGE, detektorom (UV–VIS detektor, vodivostný detektor a iné) a systémom na spracovanie dát, ktorý je spojený s počítačom. Rýchlosť migrácie jednotlivých častíc v elektrickom poli je daná ich veľkosťou, elektroforetickou mobilitou a mobilitou elektroosmotického toku, ďalšie detaily poskytuje rada literatúr a kníh o CE [24–26]. Výhodou CE je, že vzniknuté Joulovo teplo, ktoré ovplyvňuje elektroforetickú separáciu je účinne odvádzané vzhľadom k úzkemu profilu kapiláry. Nabité častice migrujú počas separácie kapilárou rozdielnou rýchlosťou voči sebe a tým vytvárajú samostatné zóny. Tieto zóny vykazujú rozdielny analytický signál než BGE a na CE záznamu sú zobrazené ako píky.



Obr. 3: Schéma CE; E1, E2 – elektródy, VN – vysoké napätie, V1, V2 – vialky s BGE, PC – počítač [17].

CE predstavuje vysoko účinný analytický separačný systém nielen na separáciu makromolekúl, ako bola najskôr využívaná, ale aj na analýzu malých iónov z komplexnejších vzoriek, ktoré sú pripravené na analýzu pomocou prekoncentračných techník. Výhodou CE je jej jednoduché prevedenie, vysoká separačná účinnosť, minimálna spotreba činidiel a vzoriek (1–10 μL) a cenová nenáročnosť na spotrebný materiál. Nevýhodou tejto techniky je nižšia dlhodobá stabilita oproti chromatografickým technikám a nižšia citlivosť detekcie pokiaľ je kombinovaná s najpoužívanejším detektorom (UV–VIS). Nižšia stabilita kapilárnej elektroforézy môže byť

spôsobená zmenami elektroosmotického toku, ktoré môžu byť vyvolané zmenami vo vnútornej časti kremennej kapiláry [3, 17, 24–28].

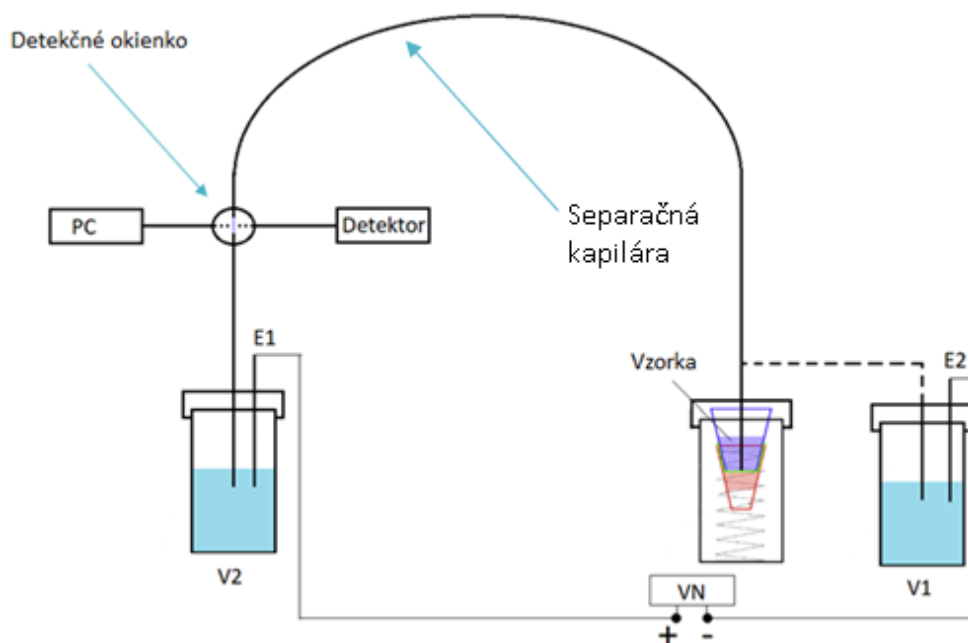
3.1.1 Kapilárna zónová elektroforéza (CZE)

Kapilárna zónová elektroforéza (CZE) patrí medzi najpoužívanejšiu elektromigračnú techniku. O jej spopularizovanie sa postarali dvaja analytíckí chemici Jorgenson a Lukács 1981 [29]. Presnejšie označenie je CZE vo voľnom roztoku (FSCE). V tomto usporiadaní je možné súčasne separovať anióny, kationy a elektroneutrálne častice. Túto vlastnosť zabezpečuje elektroosmotický tok. Separáciu rôznych analytov môžeme ovplyvniť zložením BGE. V analytickej praxi sa využívajú, okrem iných (polymérne materiály), kapiláry vyrobené z taveného kremeňa, ktoré sú dodatočne pokryté vrstvou polyimidu, ktorý zvyšuje ich mechanickú odolnosť. Vrstva polyimidu sa odstraňuje v mieste, kde sa nachádza detekčné okienko. Následne je vrstva polyimidu odstránená aj na oboch koncoch kremennej kapiláry, aby sa roztoky nedostali medzi polyimid a sklenenú stenu kapiláry. Hodnoty aplikovaného napätia bývajú v rozsahu 5–30 kV a im odpovedajúce prúdy v rozsahu desiatok μA . Objem vzorky, ktorá je dávkovaná do systému, je veľmi malý obyčajne 10 až 100 nL. Dávkovanie vzorky prebieha buď hydrodynamicky, čiže jeden koniec kapiláry sa ponorí do vialky, ktorá obsahuje roztok vzorky a z nej sa potom pomocou tlaku dávkuje potrebný objem do kapiláry. Druhá menej používaná možnosť dávkovania je elektrokineticky. Vzorka v tomto prípade musí byť ionizovaná a po ponorení konca kapiláry do roztoku sa pomocou vhodnej polarít zbera napätia zaistí migrácia do kapiláry. Jednou z možností je hydrodynamické dávkovanie pomocou gravitácie, kedy koniec kapiláry je ponorený do analyzovaného roztoku a druhý koniec kapilára je ponorený v BGE a vytvorí sa rozdiel polôh kapilár (rozdiel hladín roztokov s ponorenými koncami). Najčastejšie využívané detektory bývajú založené na meraní absorbancie v UV oblasti, fluorescencie, vodivosti. CE poskytuje veľké množstvo výhod ako sú napríklad vysoká analytická účinnosť, nízke časy separácie a minimálne množstvo roztokov potrebných pre analýzu. CZE má dôležitý význam v analýze biologických vzoriek ako proteínov a peptidov. Využíva sa ale aj na separáciu aminokyselín, biopolymérov, rôznych liečiv a ich metabolitov v komplexnejších biologických vzorkách. Charakteristickým príkladom pre kapilárnu zónovú elektroforézu je separácia nízkomolekulárných iónov [1, 6, 24–26].

4 Prepojenie CZE s SLM

Spojenie CZE spolu s SLM extrakciou zabezpečuje vysokú výťažnosť pri nízkom objeme akceptorového roztoku. Tvoria lepšie in-line usporiadanie, ako v prípade kombinácií iných analytických techník s SLM extrakciou. Extrakcie, ktoré pracujú s SLM využívajú zvyčajne vyššie objemy donorových roztokov a naopak menšie množstvo akceptorových roztokov. Rozdiel medzi objemom akceptorového a donorového roztoku zabezpečuje obohacovanie akceptorového roztoku analyzovanými analytmi. Objem akceptora je zvyčajne v rozmedzí

5 až 50 μL , čo korešponduje s väčšinou množstiev vzoriek, ktoré sú následne využívané pre dávkovanie do analytických systémov. Priame naviazanie SLM extrakcie na CZE je význačné tým, že nie je nutné previesť akceptorový roztok priamo do injekčného systému elektroforetického prístroja, pretože objemy používané pri dávkovaní do CZE systému sú približne o dva až tri rady nižšie.

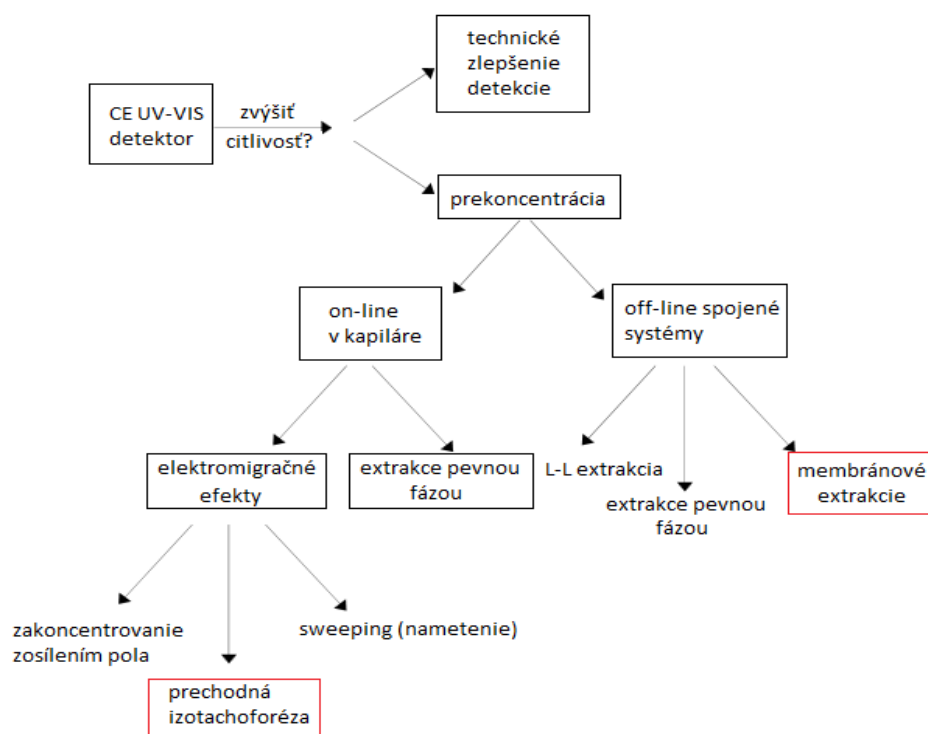


Obr. 4: Prepojenie CZE s extrakciou cez SLM [17].

Prvé zmienky o využití CZE s SLM extrakciou popísala Pálmarsdóttir 1996 [30] pre tubulárne usporiadanie. Prepojenie CZE spolu s SLM zahŕňa manuálny krok, pretože kapilára musí byť umiestnená do elektródovej nádoby hneď po nastreknutí analytu [17–18, 31].

5 On-line prekoncentračné techniky

On-line prekoncentračnými technikami je myslená súčasné skoncentrovanie a separácia vzorku. V súčasnej dobe je snaha o mnohonásobné zvýšenie citlivosti detekcie CE prioritou. Možnosti ako zvýšiť citlivosť CE je hneď niekoľko. Napríklad použitie citlivejších detektorov (laserom indukovaná fluorescencia (LIF), hmotnostná spektrometria (MS), a iné). Samostatným spôsobom ako zvýšiť citlivosť CE je možnosť použiť on-line prekoncentračné techniky.



Obr. 5: Rozdelenie On-line prekoncentračných techník [32].

Výhodou prekoncentračných techník je rýchla a jednoduchá analýza, ktorá, nie je finančne náročná ako v prípade použitia niektorých z vyššie spomínaných detektorov. Zahrňuje v sebe minimum operácií so vzorkou. Princípom je skoncentrovanie analytov do úzkej zóny a následná CE/CZE separácia analytov. Možností usporiadania on-line prekoncentračných techník je veľa. Najčastejšie sa môžeme stretnúť so šiestimi základnými typmi, ktoré sú popísané v nasledujúcich kapitolách. [32–33]. Pojem zaostrovací efekt bol po prvýkrát použitý Tiseliusom (1965) a jeho spolupracovníkmi v polyakrylamidovej gélovej elektroforéze [34]. Tiselius a kolektív dokázali, že zaostrovanie vzoriek môže poskytnúť zvýšenie citlivosti detekcie 10 až 1000 krát [34].

5.1 Normal stacking mode (NSM)

Táto technika patrí medzi najjednoduchšie zaostrovacie postupy. Princípom je rozpustenie vzorky v matrici o nižšej vodivosti akú má BGE a následne je výsledná vzorka dávkováná hydrodynamicky do separačného systému. Analyty sa zaostávajú na rozhraní medzi matricou o nízkej vodivosti a BGE, kvôli zmenám elektrického pola a vodivosti a tie vyvolávajú zmenu v rýchlosti migrácie iónov. Obmedzením v NSM je krátka optimálna dĺžka zóny, ktorá môže byť vstreknutá do kapiláry bez straty účinnosti separácie, alebo rozlíšenia. Dôvodom je rozšírenie zaostrovanej zóny, ktorá je výsledkom miešania nízkej a vysokej vodivosti na rozhraní koncentrácie a laminárny tok vznikajúci vo vnútri kapiláry [34].

5.2 Large volume sample stacking (LVSS)

Dávkovanie technikou LVSS je hydrodynamické a trvá výrazne dlhšie ako pri dávkovaní vzorky pomocou NSM. Po nadávkovaní zóny vzorky do kapiláry sa aplikuje napätie o opačnej polarite oproti tomu aká bude použitá na vlastnú separáciu. Dôsledkom toho migruje matrica v smere von z kapiláry a na začiatku kapiláry sa vytvorí malá zóna, ktorá vznikla skoncentrovaním analytov. Analyzovaná vzorka je vo väčšine prípadov rozpustená v BGE s nižšou iónovou silou vzhľadom k separačnému BGE. Metóda je v praxi veľmi jednoducho realizovateľná a teda sa stáva najčastejšie používanou metódou zaostrovania. Technika poskytuje približne až desať násobné skoncentrovanie [34–36].

5.3 Transient isotachophoresis (tITP)

Je to forma ITP a jej výhodou je jednoduchšie prepojenie s CZE. Metóda môže skoncentrovať veľké aj malé molekuly. Existujú dve možné prepojenia tITP s CZE. Prvá metóda je založená na výbere BGE s takými vlastnosťami, aby častica s nábojom (ko-ión BGE) mala vyššiu efektívnu mobilitu ako analyzované analyty. Princípom ITP migrácie je výber vhodného koncového elektrolytu (môže byť použitý ako náhrada za BGE, alebo je možné ho dávkovať ako samostatnú zónu). Dávkuje sa spravidla za zónou vzorky. Vedúci ión je v tomto prípade ko-ión (častica s nábojom) základného elektrolytu. Dávkovanie vzorky môže prebiehať hydrodynamicky aj elektrokineticky a následne prebehne výmena vialky so vzorkou za BGE. Po vložení elektrického pola vzniká prechodný ITP stav. Druhá metóda sa vyskytuje vtedy ak nabitá častica (ko-ión) v BGE má nižšiu efektívnu mobilitu ako je analyzovaný ión. V takomto prípade sa pridáva do vzorky vedúci ión, napríklad NH_4^+ , ktorý je určený pre separáciu kationov. Ako koncový ión je v tomto prípade ko-ión BGE. To predstavuje obrovskú výhodu, pre analýzu biologických vzoriek, ktoré väčšinou obsahujú určité množstvo solí o vysokej efektívnej mobilite vhodné na uskutočnenie tITP prekoncentrácie. tITP je veľmi účinná v oblasti prekoncentrácie a s využitím v CZE čím sa zvyšujú jej limity detekcie. Je oveľa náročnejšia na zaostrenie ako klasická ITP. Citlivosť sa môže pri tomto postupe zvýšiť až 1000krát [32, 36–37].

5.4 Dynamic pH junction

Po prvýkrát ju použil Britz-McKibbin 2003 [38]. Princíp spočíva v práci s elektroforetickými mobilitami a pH. Metóda je podobná izoelektrickej fokusácii, len s malým rozdielom, že namiesto amfolytov sa využíva BGE s rozdielnymi hodnotami pH. Všeobecne platí, že vzorka je nastavená na nižšiu pH hodnotu ako je pK_a analytu. BGE je nastavený na vyššiu hodnotu pH ako je pK_a analytu. Preniknutím vzorky do oblasti BGE o určitom pH nastáva neutralizácia náboja analytu a dej sa znovu opakuje, až kým nevznikne úzka zóna prekoncentrovaných analytov. Po skončení sa analyty rozdelia princípom CZE [33, 36, 39].

5.5 Sweeping

Pôvodne bola táto technika navrhnutá pre neutrálne analyty v MEKC. Princíp spočíva v interakcii analytov (ión, alebo neutrálna molekula) spolu s pseudostacionárnou fázou (micelotvorná látka), ktorá takto migruje zónou vzorky. Technika pracuje s homogénnym elektrickým polom, preto je podmienkou, že vzorka musí mať rovnakú vodivosť akú má BGE. Micelotvorná látka je pridávaná do BGE. Obidve látky sú spolu umiestnené na dávkovacej strane kapiláry v elektrolytovej nádobke. Aplikáciou napätia pseudostacionárna fáza začne migrovať vzorkou, ktorá tvorí zónu a hromadí analyt dokým pseudostacionárna fáza nedomigruje až na koniec zóny vzorky. EOF v tejto technike nie je významný, väčšinou býva potlačený hodnotami pH elektrolytu. Táto technika je vhodná pre nabité ale aj nenabité ióny. Hlavnou podmienkou je aby interagovali spolu s pseudostacionárnou fázou [39–40].

5.6 Field amplified sample stacking (FASS)

Prvé zmienky o FASS technike boli publikované v roku 1990. Princípom FASS techniky je vzorka rozpustená vo vode, alebo v BGE, o koncentrácií 10 krát nižšej ako je pôvodný BGE. Dĺžka dávkovanej zóny vzorky sa pohybuje okolo 10 až 50 % celkovej dĺžky kapiláry. Po vložení rovnomerného elektrického pola dôjde k skoncentrovaniu vzorky, vďaka rozdielu vodivostí BGE a vzorku (nižšia vodivosť). V každej zóne (BGE, vzorka) je iná intenzita elektrického pola. To zapríčiňuje rozdielnú rýchlosť analytov v zónach (analyty v zóne vzorku sa pohybujú rýchlejšie ako v BGE zóne). Následne na rozhraní zón nastáva skoncentrovanie analytov vplyvom spomalenia iónov tzv. „stacking efekt“. FASS technika patrí medzi najpoužívanejšie a najjednoduchšie on-line prekoncentračné techniky nabitých častíc. Najčastejšie je spájaná s CZE ako analytickým systémom [33, 41].

5.7 Vlastnosti vybraných analytov

Významným faktorom pri výbere vhodných separačných podmienok sú fyzikálno-chemické vlastnosti pozorovaného analytu. Jedným z týchto faktorov je disociačná konštanta (pK_a), $\log P$ a molekulová hmotnosť analytov. Hodnoty pK_a , $\log P$ a molekulovej hmotnosti analytov bázičných liečiv sú uvedené v tab. 1. Rozdeľovací koeficient ($\log P$) vyjadruje mieru lipofility liečiva, respektíve do akej miery dané liečivo preferuje hydrofílnu, alebo hydrofóbnu prostredie. Hodnota pK_a hovorí o tom ako je daný vodík v zlúčenine kyslí. Čím vyšší je rozdeľovací koeficient tým lepšie organická fáza prijíma analyty bázičných liečiv. To sa docieli správnym nastavením pH bázičných liečiv, ktoré z pravidla by mali mať túto hodnotu vyššiu o tri jednotky ako je pK_a analytov bázičných liečiv [42].

Tab. 1: Hodnoty pK_a nortriptylinu, haloperidolu a loperamidu [42].

Analyt	Molekulová hmotnosť	Log P	pK_a
Nortriptylin	263,4	4,51	10,47
Haloperidol	375,8	4,30	8,66
Loperamid	477,0	5,50	9,41

5.8 Validačné parametre

5.8.1 Limit detekcie a limit kvantifikácie

Limit detekcie (LOD) je definovaný ako najnižšia koncentrácia analytu vo vzorke, ktorá má tri krát vyšší signál (S) ako jeho základná línia (N) [43]. Bol vypočítaný podľa vzťahu (1):

$$LOD = \frac{3S}{N}. \quad (1)$$

Limit kvantifikácie (LOQ) je definovaný ako najnižšia koncentrácia daného analytu, ktorá dovoľuje kvantitatívne vyhodnotenie a šum (N) základnej línie je 10 krát menší ako je analytický signál (S) sledovaného analytu [43]. LOQ bol počítaný podľa vzťahu (2):

$$LOQ = \frac{10S}{N}. \quad (2)$$

5.8.2 Rozlíšenie

Rozlíšenie (RS) medzi dvoma píkmi s podobnými výškami sa vypočíta pomocou vzťahu (3):

$$RS = \frac{1,18(t_{r2} - t_{r1})}{w_{h1} + w_{h2}}. \quad (3)$$

kde $t_{r2} > t_{r1}$, t_{r1} a t_{r2} sú migračné časy alebo vzdialenosti podľa základnej línie medzi bodom nástreku a kolmicami spustenými z vrcholov dvoch susedných pík a w_{h1} a w_{h2} sú šírky pík v polovici ich výšky. Rozlíšenie vyššie ako hodnota 1,5 sa považuje za dostatočnú separáciu pík [43].

5.8.3 Signál šum

Pomer signál šum bol vypočítaný ako pomer signálu sledovaných analytov (S) a šumu základnej línie (N) [43]. Výsledná vzťah (4):

$$SN = \frac{S}{N}. \quad (4)$$

6 Experimentálna časť

6.1 Používané prístroje a roztoky

Analýzy boli prevedené pomocou CE 7100 od firmy Agilent Technologies, Nemecko. Bolo aplikované napätie 15–30 kV, detekcia prebiehala pomocou UV-VIS detektora s diódovým polom (DAD) pri vlnovej dĺžke 200 nm. Separačná časť bola tvorená kremennou kapilárou (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) o vnútornom priemere 75 μm a celkovej dĺžke 45 cm (efektívna dĺžka kapiláry bola 36,5 cm). Na kapiláre bolo vytvorené detekčné okienko vypálením vrstvy polyimidu. Vrstva polyimidu bola vypálená 2 mm na obidvoch koncoch kapiláry. Nová kapilára bola premývaná 100mM hydroxidom sodným (10 minút), deionizovanou vodou (5 minút) a roztokom BGE (5 minút). Pred každou ďalšou analýzou bola kapilára premývaná po dobu 30 sekúnd 50mM hydroxidom sodným, 30 sekúnd deionizovanou vodou a nakoniec 30 sekúnd roztokom BGE. Na konci dňa bola kapilára prepláchnutá 50mM NaOH, deionizovanou vodou a nakoniec vzduchom, všetko po dobu 5 minút. Všetky čistiace kroky prebiehali pri konštantnom tlaku 950 mbar. Hydrodynamické dávkovanie vzoriek bolo prevádzkané pri tlaku 50 mbar po dobu 5–20 s. Separácia analytov prebiehala pri konštantnej teplote 25 °C. Analytický signál z CE 7100 bol spracovaný v programe ChemStation CE.

6.1.1 Zásobné roztoky

Zásobný roztok jednotlivých analytov bázičných liečiv o koncentrácií 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, Nemecko) bol pripravený rozpustením čistých substancií (nortriptylin a haloperidol), alebo ich derivátov (loperamid) v čistom metanole (Sigma) v pomere 1:1:1. Vznikol pracovný roztok o koncentrácií 333 $\mu\text{g/ml}$. Výsledný roztok bol skladovaný v mrazničke pri teplote -20 °C a chránený pred svetlom.

Zásobný roztok octanu amónneho bol pripravený navážením čistej substancie octanu amónneho (Fluka, Nemecko) a rozpustením v deionizovanej vode. Výsledná koncentrácia roztoku octanu amónneho bola 1 M. Uskladnenie prebiehalo v chladničke pri teplote 4 °C.

Zásobný roztok kyseliny octovej (99,8%, Fluka,) bol riedený deionizovanou vodou na výslednú koncentráciu 1 M. Výsledný roztok bol uchovávaný v chladničke pri teplote 4 °C.

6.1.2 Príprava základného elektrolytu

Zásobný roztok základného elektrolytu bol pripravený riedením koncentrovanej kyseliny octovej (37%, Fluka) deionizovanou vodou tak aby bola výsledná koncentrácia 1 M. Pracovný roztok elektrolytu kyseliny octovej bol riedený deionizovanou vodou na výslednú koncentráciu 300 mM (pH 2,64). Následne bol roztok prefiltrovaný pomocou jednorazového striekačkového filtru (0,45 μm , Minisart RC 25, Nemecko). Takto pripravený roztok BGE bol pripravovaný denne.

6.1.3 Roztoky používané pre mikroextrakcie

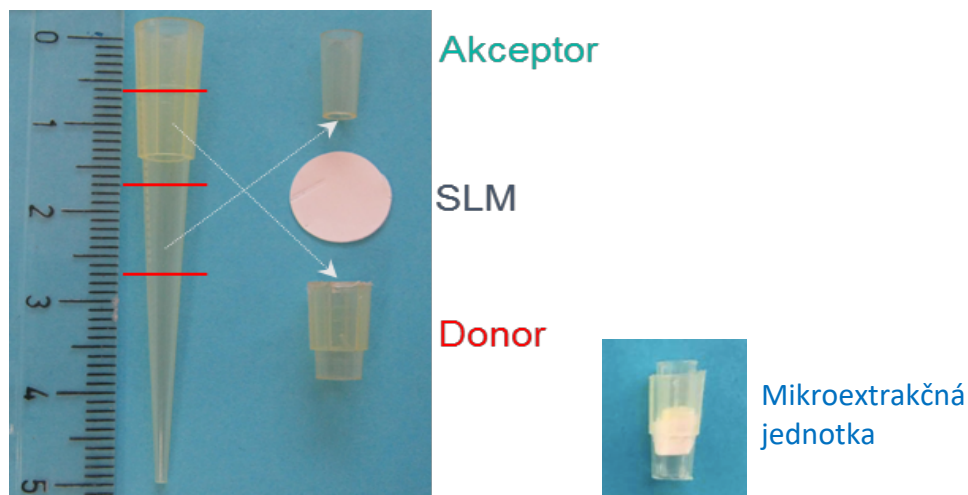
Ako akceptorový roztok sa používala kyselina chlorovodíková (Pliva-Lachema, Česká republika) o koncentracii 10 mM. Donorovým roztokom bol hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika) o koncentracii 10 mM. Organickým rozpúšťadlom používaným na impregnáciu SLM bol 1-ethyl-2-nitrobenzen (ENB, Fluka). Roztoky boli uchovávané v chladničke pri teplote 4 °C.

6.1.4 Reálne vzorky

Reálne vzorky boli pripravené riedením pracovného roztoku bázičských liečiv o koncentracii 333 µg/ml fyziologickým roztokom NaCl (Pliva-Lachema) o koncentracii 150 mM, alebo reálnou matricou, ktorou bol ľudský moč. Výsledná koncentrácia liečiv bola 1 µg/ml. Takto pripravený roztok bol zalkalizovaný 10mM NaOH. Analýza reálnych vzoriek prebiehala iba v deň odberu.

6.2 Príprava mikroextrakčnej jednotky

Príprava mikroextrakčnej jednotky pozostávala z výrezu plastovej špičky, ktorá sa využíva pri pipetovaní. Postup zostrojenia mikroextrakčnej jednotky bol prevzatý z práce [17]. Medzi dva vybrané diely špičky sa vložila polypropylénová membrána (Membrana GmbH, Nemecko) s priemerom pórov 0,1 µm a hrúbkou 100 µm (viď obr. 6). Polypropylénová membrána bola vyrezaná pomocou korkovrtu o priemere 11 mm. Následne bola membrána naimpregnovaná organickým rozpúšťadlom (ENB) o objeme 5 µl a stlačená medzi dva výrezy špičky a tým došlo k vytvoreniu mikroextrakčnej jednotky s oddelenými priestormi pre akceptorový a donorový roztok. Do spodnej časti mikroextrakčnej jednotky bol dávkován donorový roztok o objeme 20 µl. Do vrchnej časti mikroextrakčnej jednotky bol dávkován akceptorový roztok o objeme 10 µl. Po nadávkovaní akceptorového roztoku začala prebiehať mikroextrakcia. Takto pripravená mikroextrakčná jednotka bola umiestnená do PP vialky Agilent (obj. č. 51820567), na oceľovú pružinku (Pružiny Čermák, Česká republika) o výške 7 mm. Pružinka uvoľňovala tlak, ktorý vzniká pri priamom kontakte kapilára–membrána a tým zabráňuje mechanickému pretrhnutiu membrány. Vialka spolu s mikroextrakčnou jednotkou bola umiestnená do systému CE. Následne po nadávkovaní bola akceptorová časť mikroextrakčnej jednotky analyzovaná. Pre každé nové meranie bola vyhotovená nová mikroextrakčná jednotka.



Obr. 6: Zostrojenie mikroextrakčnej jednotky. Vľavo: špička z pipety, v strede: vyrezané časti pipety spolu s PP membránou nenaimpregnovanou, vpravo mikroextrakčná jednotka [17–37].

6.3 Nastavenie tITP

Zóna octanu amónneho o koncentrácii 200 mM bola hydrodynamicky dávkováná pri tlaku 50 mbar po dobu 5–20 s. Dávkovanie zóny octanu amónneho prebiehalo ešte pred nadávkovaním analytov bázičských liečiv.

7 Výsledky a diskusia

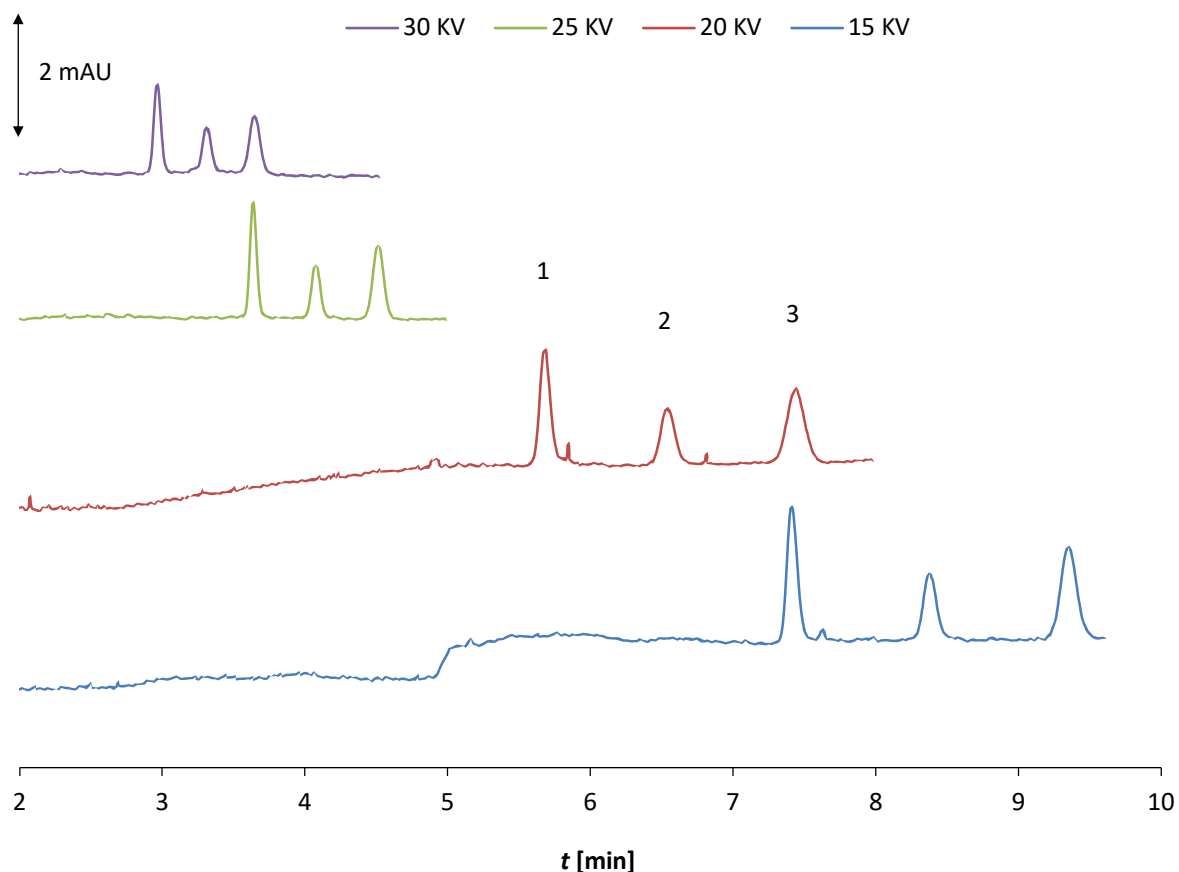
7.1 Optimalizácia separácie

7.1.1 Voľba BGE

BGE bol volený pre zaistenie kyslých podmienok v CE systéme. Tým sa zabezpečili vhodné podmienky pre ionizáciu všetkých použitých analytov. Tieto podmienky splňuje kyselina octová ako BGE. Jej tabelovaná hodnota pK_a je 4,76 pri 25°C [43–44].

7.1.2 Optimalizácia separačného napätia (bez zaostrovacej zóny octanu amónneho)

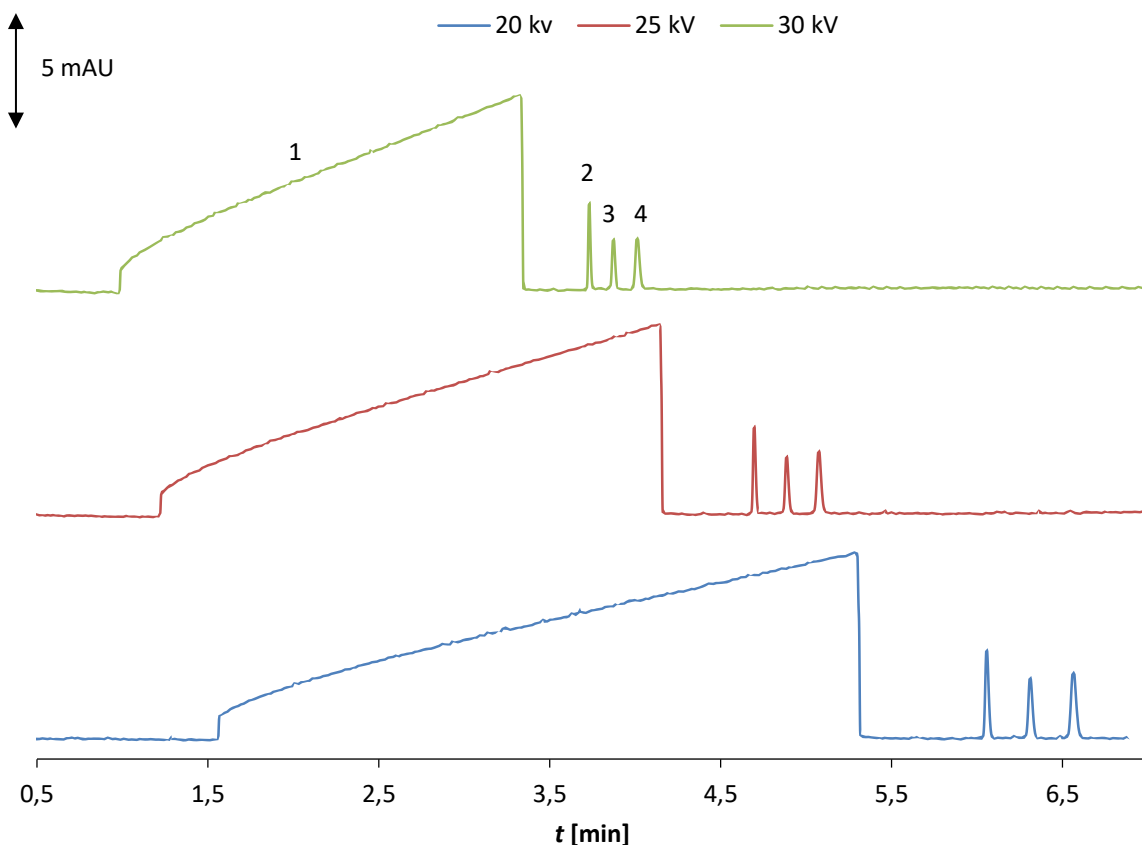
Na optimalizáciu separačného napätia boli použité podmienky (viď v kapitole 6.1). Boli testované napätia o hodnotách 15, 20, 25 a 30 kV. Výsledky sú znázornené na obr. 7, z ktorého vyplýva, že pri napätí +15 kV a +20 kV je migračný čas analytov bázičských liečiv príliš dlhý. Pri hodnote +30 kV je migračný čas molekúl najkratší, ale výška a rozlíšenie sú najnižšie. Najvhodnejšia optimálna hodnota vkladaneho napätia je +25 kV. Migračný čas analytov je uspokojivo krátky. Píky analytov sú dostatočne zaostrené a analyty sú od seba optimálne rozseparované.



Obr. 7: Porovnanie rozdielnych hodnôt vkladanej napätia na CE systém. Podmienky: BGE bola 300mM kyselina octová, hydrodynamické dávkovanie bázičných liečiv ($1 \mu\text{g/ml}$) po dobu 5 s. 1-nortriptylin, 2-haloperidol, 3-loperamid.

7.1.3 Optimalizácia separačného napätia (so zaostrovacou zónou octanom amónnym)

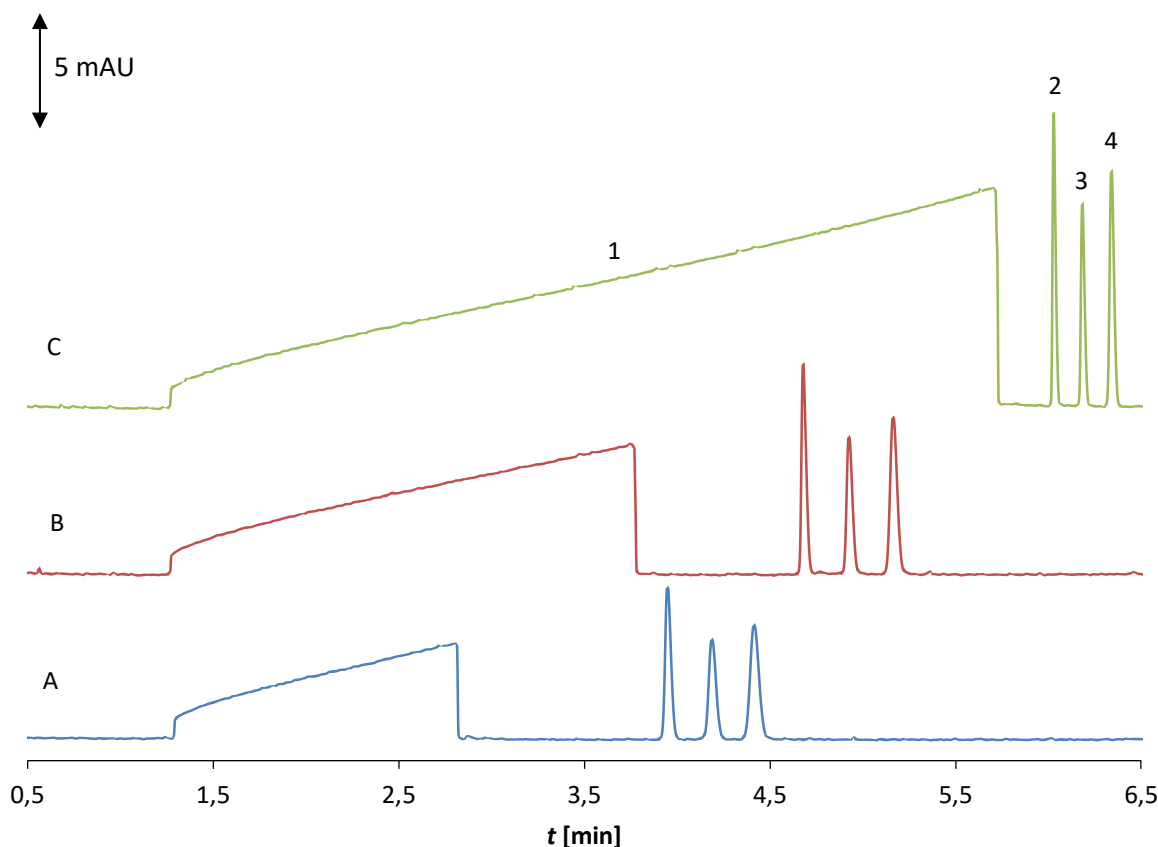
V ďalšom kroku experimentu bola implementovaná na nestrekový koniec zóna octanu amónneho pre zaostrenie analytov. Podmienky analytického systému boli zachované (viď v kapitole 6.1). Bolo vkladané separačné napätie s hodnotami +20, +25 až +30 kV. Hodnota napätia +15 kV nebola aplikovaná na základe výsledkov z predchádzajúceho experimentu (viď v kapitole 7.1.2). Výsledky sú zobrazené na obr. 8. Pri separačnom napätí +25 a +30 kV sú migračné časy analytov bázičných liečiv dostatočne krátke. Rozlíšenie pík separovaných analytov je horšie. V prípade +25 kV je rozlíšenie 5,45 a pri 30 kV je rozlíšenie 4,72. Pomer signál/šum je približne rovnaký pri obidvoch hodnotách napätia 25 a 30 kV. Najlepšie rozlíšenie (5,79) analytov je pri separačnom napätí +20 kV. Signál/šum je najvyšší a preto bola pre ďalšie experimenty zvolená táto hodnota napätia ako konštantná.



Obr. 8: Porovnanie rozdielnych hodnôt vkladanejho napätia na CE. Podmienky: BGE bola 300 mM kyselina octová, hydrodynamické dávkovanie bázičných liečiv (1 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 5 s, hydrodynamické dávkovanie octanu amónneho (200 mM) po dobu 15 s. 1-zóna octanu amónneho, 2-nortriptylin, 3-haloperidol, 4-loperamid.

7.1.4 Optimalizácia koncentrácie zóny octanu amónneho

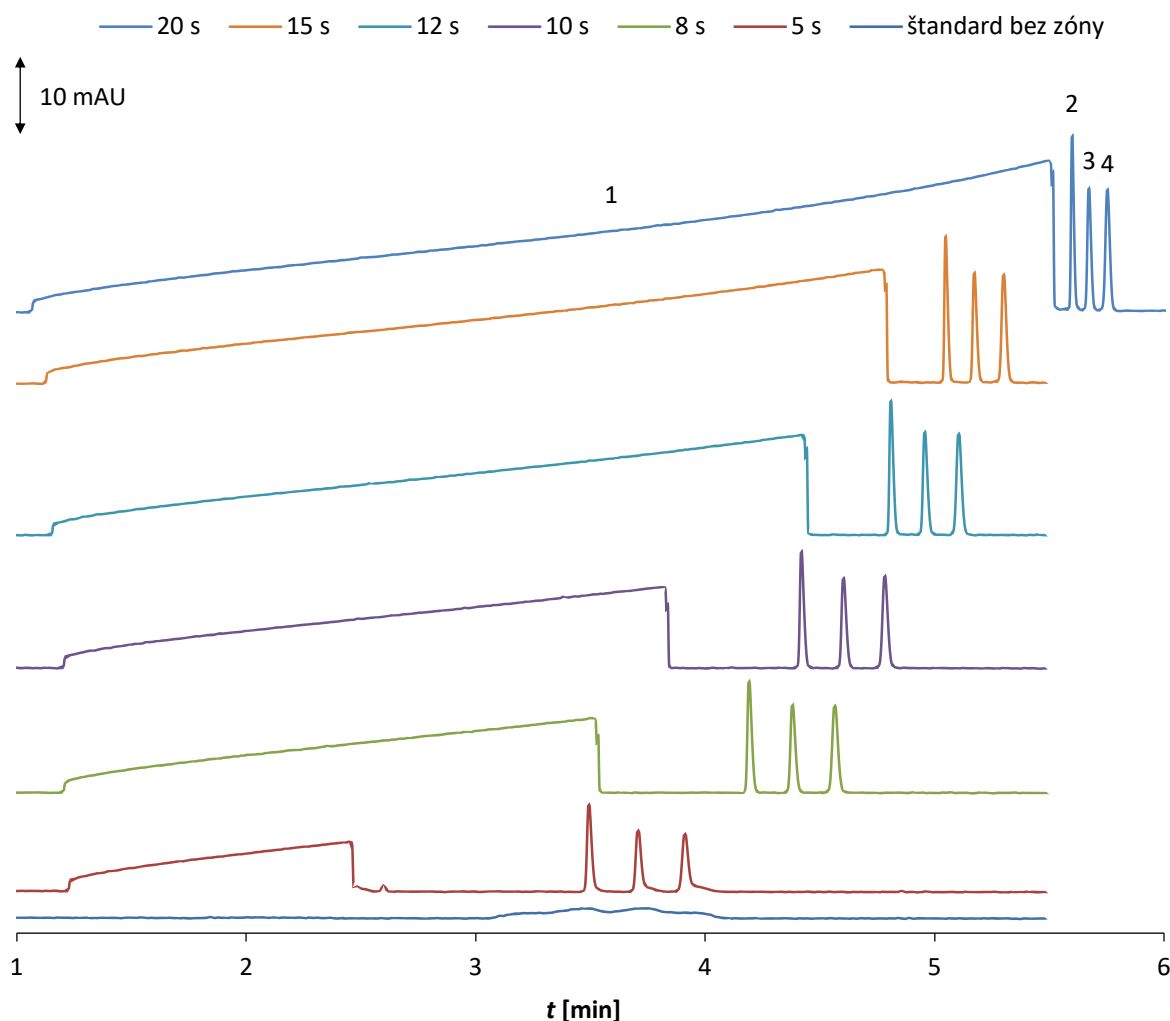
Na optimalizáciu boli vybrané konštantné podmienky doby dávkovania liečiv a doby dávkovania zóny octanu amónneho na 15 s. Pre optimalizácie bola zvolená stúpajúca koncentračná rada octanu amónneho (50, 100, 200 mM). Podmienky analytického systému boli zachované (viď v kapitole 6.1). Výsledky optimalizácie sú zobrazené na obr. 9. Pri aplikovaní 50mM octanu amónneho (obr. 9-A) pík haloperidolu (3) vykazuje dostatočné rozlíšenie 3,99. Pomer signálu k šumu je najnižší. Pri 100mM zóne octanu amónneho (obr. 9-B) je rozlíšenie pík 4,14 a pomer signál/šum je nižší ako v prípade 200mM koncentrácie octanu amónneho (obr. 9-C). Zóna octanu amónneho o koncentrácii 200 mM poskytuje najlepšie rozlíšenie pík 4,61. Pomer signál/šum je najvyšší a preto bola zvolená koncentrácia octanu amónneho na 200 mM, pri ktorej dochádza k dostatočnej separácii a zaostreniu sledovaných analytov.



Obr. 9: Optimalizácia koncentrácie zóny octanu amónneho. Podmienky: BGE bola 300 mM kyselina octová, hydrodynamické dávkovanie bázičných liečiv ($1 \mu\text{g/ml}$) po dobu 15 s, hydrodynamické dávkovanie octanu amónneho 15 s, koncentrácia octanu amónneho (A-50mM, B-100mM, C-200mM). 1-zóna octanu amónneho, 2-nortriptylin, 3-haloperidol, 4-loperamid.

7.1.5 Optimalizácia hydrodynamického dávkovania zóny octanu amónneho

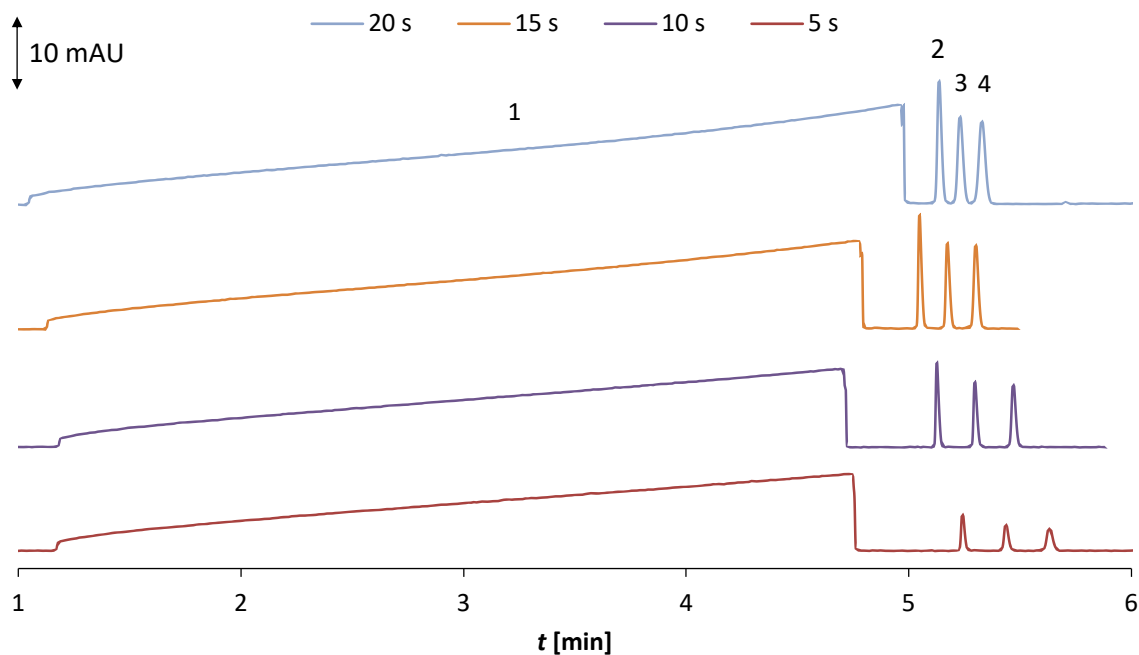
Optimalizácia dávkovania zóny octanu amónneho prebiehala v časových intervaloch 0, 5, 8, 10, 12, 15 a 20 s a jeho koncentrácia bola 200 mM. Analyty bázičných liečiv ($1 \mu\text{g/ml}$) boli rozpustené v 10mM kyseline chlorovodíkovej. Dávkovanie bázičných liečiv prebiehalo po dobu 15 s. Podmienky analytického systému boli zachované z kapitoly 6.1. Výsledky optimalizácie sú zobrazené na obr. 10. Hydrodynamické dávkovania v časoch 5, 8, 10 a 12 s poskytujú dostatočné rozlíšenie, ale nízky pomer signál/šum analytov. Pri 20 s hydrodynamického dávkovania zóny octanu amónneho dochádza k najlepšiemu pomeru signálu k šumu a rozlíšenie pík bázičných liečiv je dostačujúce (2,57). Najlepším výsledkom je ale hydrodynamické dávkovanie zóny octanu amónneho v čase 15 s. V tomto čase sú analyty bázičných liečiv dostatočne rozlíšené (3,96) a hodnoty pomeru signál/šum sú dostatočne vysoké. Pre ďalšie merania boli preto zvolené časy dávkovania zaostrovacej zóny octanu amónneho na 15 s.



Obr. 10: Optimalizácia doby dávkovania zóny octanu amónneho. Podmienky: BGE bola 300 mM kyselina octová, hydrodynamické dávkovanie bázičných liečiv (1 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 15 s, hydrodynamické dávkovanie octanu amónneho (200mM) v časoch 0, 5, 8, 10, 12, 15, 20 s. 1-zóna octanu amónneho 2-nortriptylin, 3-haloperidol, 4-loperamid.

7.1.6 Optimalizácia hydrodynamického dávkovania vzoriek

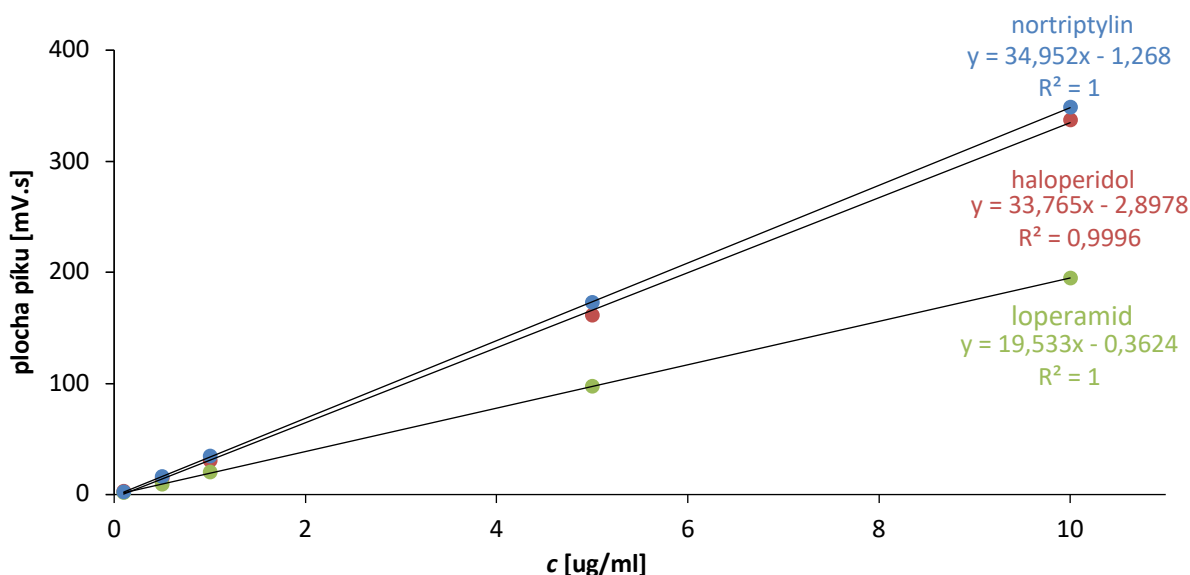
Optimalizácia dávkovania analytov o koncentrácií 1 $\mu\text{g/ml}$ v prostredí 10mM HCl prebiehala v časových intervaloch 5, 10, 15 a 20 s. Dávkovanie octanu amónneho o koncentrácií 200 mM bolo nastavené na konštantných 15 s. Výsledky sú vyobrazené na obr. 11. Hydrodynamické dávkovanie bázičných liečiv v čase 5 a 10 s sú nevyhovujúce z dôvodu nízkeho pomeru signál/šum. Dávkovanie v čase 20 s vykazuje najvyšší pomer signál/šum, ale rozlíšenie nortriptylinu (2,21) a haloperidolu (1,86) je nižšie ako v prípade 15 s. Ďalej je vidieť, že medzi zónou octanu amónneho a píkmi nie je priestor pre prípadnú migráciu matričných látok z reálnych matric. Najlepším výsledkom optimalizácie je preto 15 s dávkovania, kde rozlíšenie píkav pre nortriptylin (3,96) a haloperidol (3,44) je dostatočné a pomer signál/šum je taktiež dostatočujúci. V ďalších meraniach bolo hodnota dávkovania liečiv zvolená na 15 s a dávkovanie zóny octanu amónneho na 15 s (viď v predchádzajúcej kapitole 7.1.5)



Obr. 11: Optimalizácia doby dávkovania bázičých liečiv v 10mM HCl (nortriptylin, haloperidol, loperamid). Podmienky: BGE bola 300mM kyselina octová, hydrodynamické dávkovanie octanu amónneho (200mM) po dobu 15 s, hydrodynamické dávkovanie bázičých liečiv (1 $\mu\text{g/ml}$) v časoch 5, 10, 15, 20 s. 1-zóna octanu amónneho, 2-nortriptylin, 3-haloperidol, 4-loperamid.

7.2 Stanovenie kalibračnej závislosti a medze detekcie CE metódy

Bola pripravená kalibračná rada o koncentráciách 0,1; 0,5; 1; 5; 10 $\mu\text{g/ml}$ vid' obr. 12. Detekcia bola prevedená pri vlnovej dĺžke 200 nm. Vlnová dĺžka bola vybraná na základe predchádzajúcich meraniach [45].



Obr. 12: Kalibračná krivka bázičých liečiv. Podmienky: BGE bola kyselina octová o koncentrácii 300mM, hydrodynamické dávkovanie octanu amónneho (200mM) po dobu 15 s, hydrodynamické dávkovanie bázičých liečiv (1 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 15 s.

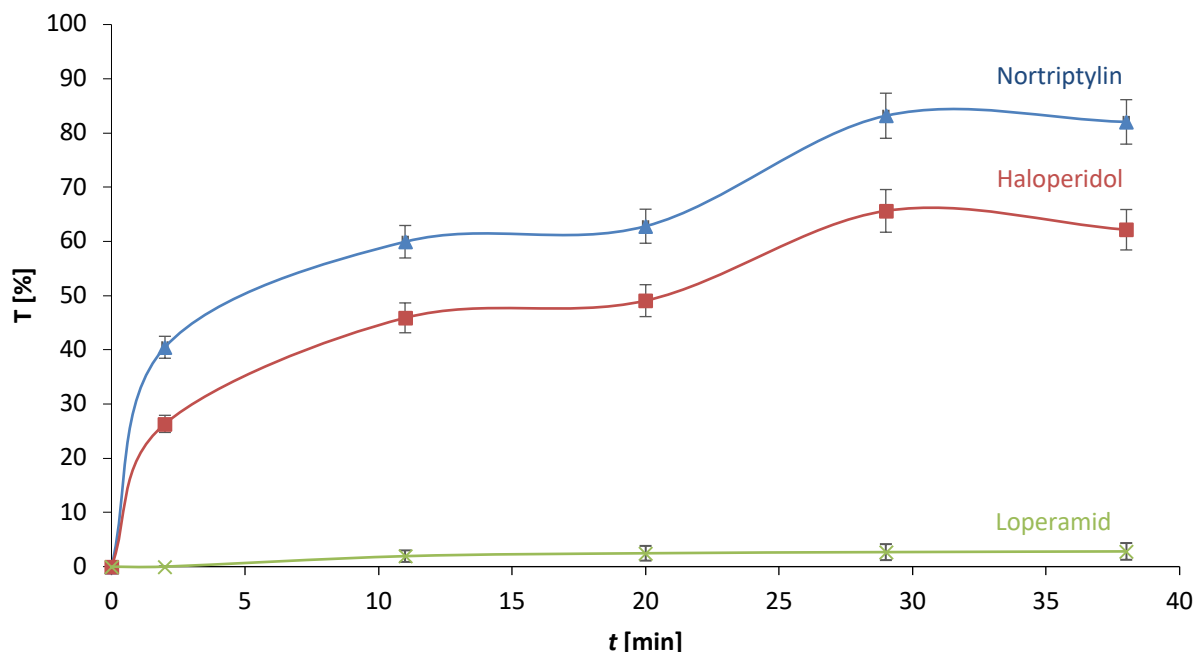
Následne bol vypočítaný limit detekcie (LOD) a medze stanoviteľnosti (LOQ). LOD je definovaný ako najnižšia koncentrácia analytov, ktorá má trikrát vyšší signál, ako je šum základnej línie [45]. LOQ odpovedá najnižšej koncentrácii analytov, pri ktorej je presnosť stanovenia taká, že dovoľuje kvantitatívne vyhodnotenie a šum základnej línie je desať krát menší ako je daný analytický signál [45]. Hodnota relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD) pre plochy analytov bázičských liečiv bola vzatá z piatich meraní a jej hodnoty nie sú väčšie ako 2,9%. Vypočítané hodnoty LOQ, LOD, relatívnej smerodajnej odchýlky a korelačného koeficientu sú zobrazené v tab. 2.

Tab. 2: Vypočítané limity detekcie, medze stanoviteľnosti, relatívnej smerodajnej odchýlky a korelačného koeficientu pre štandardy bázičských liečiv (1 µg/ml). Kalibračný rozsah 0,1–10 µg/ml, n=5.

	Nortriptylin	Haloperidol	Loperamid
LOQ [µg/ml]	0,0170	0,0220	0,0220
LOD [µg/ml]	0,0050	0,0070	0,0070
RSD [%]	2,9	2,7	2,8
R²	1,0000	0,9996	1,0000

7.3 Časové priebehy mikroextrakcie cez SLM

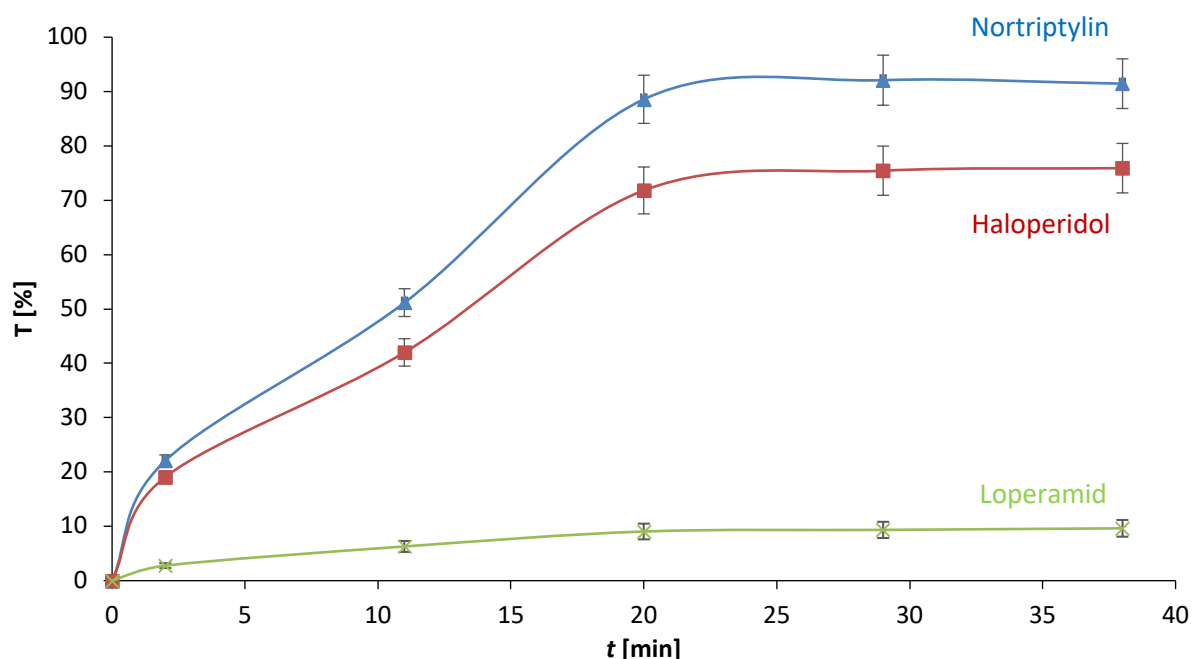
Priebeh mikroextrakcie v spojení s CE bol meraný za podmienok, kde BGE bola 300mM kyselina octová, pri hydrodynamickom dávkovaní bázičských liečiv o koncentrácií 1 µg/ml po dobu 15 s. Koncentrácia zaostrovacej zóny octanu amónneho bola 200 mM a bola dávkovaná po dobu 15 s. Analýza bola prevedená pri teplote 25°C a separačné napätie bolo 20 kV. Tieto podmienky boli optimalizované v kapitole 7.1. Meranie prebiehalo za podmienok, kedy donor o objeme 20 µl obsahoval 1µg/ml štandardných bázičských liečiv v 150mM NaCl s 10mM NaOH. Objem 10 µl 10mM HCl bol dávkovaný z akceptorovej strany mikroextrakčnej jednotky ktorá bola oddelená 100µm PP membránou impregnovanou ENB o objeme 5 µl. CE systém bol nastavený tak, aby bol akceptor dávkovaný priamo z povrchu SLM (viď kapitola 6.2). Tým sa zaistilo dávkovanie analytov, ktoré sa vyskytovali iba v oblasti difúznej vrstvy SLM. Dávkovanie prebiehalo v jednotlivých časových intervaloch a to v čase 0, 2, 11, 20, 29 a 38 minút. V čase 0 minút sa v difúznej vrstve medzi SLM a akceptorom nenachádzali žiadne analyty bázičských liečiv. V čase 0–29 minút extrakcia pozvoľna narastá. Od 29 minúty bola výťažnosť extrakcie konštantná a hodnoty prenosu cez SLM sa nemenia viac ako o 10 %. Výsledná extrakčná krivka je od tohto času konštantná a jej výťažnosť sa so vzrastajúcim časom nemení. Výsledky sú zobrazené na obr. 13.



Obr. 13: Časový priebeh mikroextrakcie cez SLM. Podmienky: D-150mM NaCl, 10 mM NaOH, 1 $\mu\text{g/ml}$ bázických liečiv, A-10 mM HCl. Podmienky: tlak 50 mbar, dávkovanie liečiv (15 s), BGE bola kys. octová o koncentrácii 300 mM, koncentrácia zóny bola 200mM a dávkovanie 15 s.

7.4 Časový priebeh mikroextrakcie reálnych vzoriek (moč)

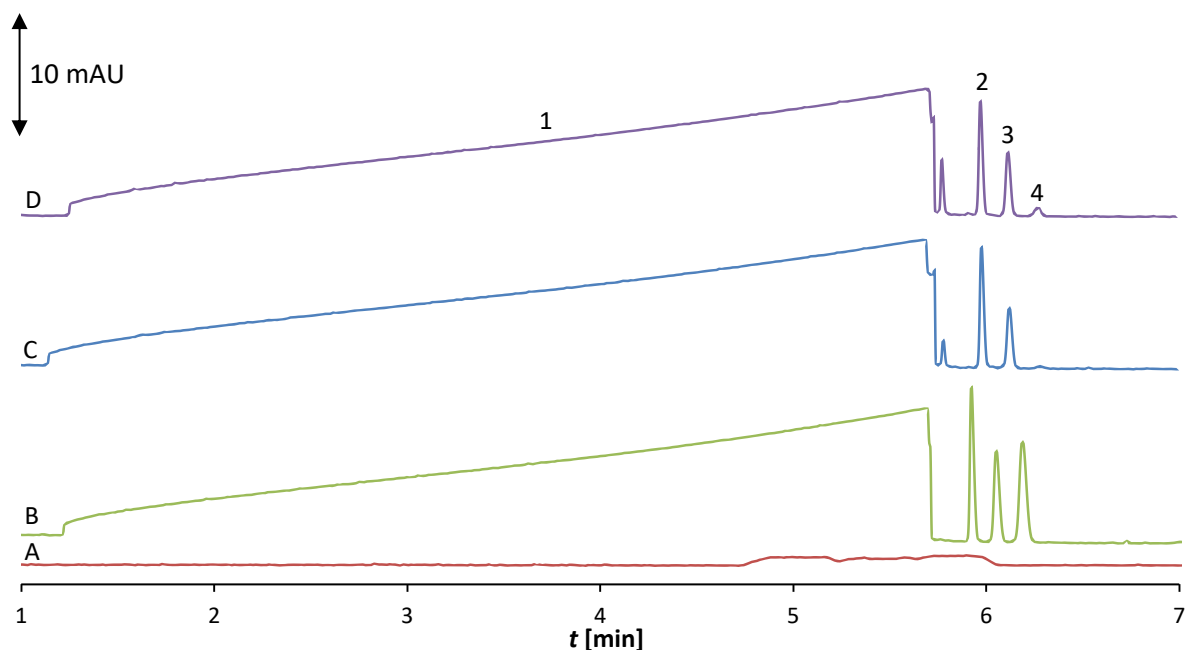
Priebeh extrakcie bol v in-line usporiadaní dávkovaný akceptor z povrchu SLM v pravidelných časových intervaloch 0, 2, 11, 20, 29 minút. Časový priebeh bol stanovený za nasledujúcich podmienok. Do extrakčnej jednotky bolo pipetované 20 μl donorového roztoku, ktorý obsahoval štandardný roztok troch bázických liečiv v ľudskom moči o koncentrácii 1 $\mu\text{g/ml}$ s 10mM NaOH. 10mM HCl o objeme 10 μl tvorila akceptorovú fázu systému. 100 μm PP membrána bola impregnovaná organickou fázou a oddeľovala spomínané vodné fázy systému. Dávkované sú len analyty, ktoré boli transportované cez membránu do akceptora. Systém CE bol nastavený tak, aby bol akceptor dávkovaný priamo z povrchu SLM (viď kapitola 6.2). Tým bolo zaistené dávkovanie analytov, ktoré sa vyskytovali iba v oblasti difúznej vrstvy SLM. V čase 0 minút sa v difúznej vrstve nenachádzali žiadne analyty bázických liečiv. Obr. 14 znázorňuje množstvo prenosu analytu z donorového roztoku do fázového rozhrania medzi SLM a akceptorom. Od 20 minúty sa výťažnosť extrakcie nemení a dochádzalo k ustáleniu rovnováhy. Krivka je konštantná aj pre dlhšie extrakčné časy.



Obr. 14: Časový priebeh mikroextrakcie cez SLM. Podmienky: D-neriedená moč, 10 mM NaOH, 1 µg/ml bázičných liečiv, A-10 mM HCl. Podmienky: tlak 50 mbar, dávkovanie analytov (15 s), BGE bola kys. octová o koncentrácii 300 mM, koncentrácia zóny bola 200mM a dávkovanie 15 s.

7.5 Validácia parametrov optimalizovaných podmienok mikroextrakcie

Vybrané optimálne podmienky mikroextrakcie z predchádzajúcej optimalizácie 7.1 boli validované. Prvá extrakcia bola prevedená bez prídavku zóny octanu amónneho (obr. 15-A). Ako je zo záznamu vidieť, bez prítomnosti octanu amónneho nedochádza k žiadnej separácii jednotlivých analytov. Čo vyplýva z nízkych hodnôt rozlíšenia (0,42) a hodnôt signál/šum. Po pridaní zóny octanu amónneho o predom optimalizovanú koncentráciu (viď kapitola 7.1.4) a doby dávkovania (viď kapitola 7.1.5), sú jednotlivé píky analytov bázičných liečiv z 10mM HCl dávkovaných po dobu 15 s dostatočne rozlíšené a separované (obr. 15-B), čomu odpovedajú vyššie hodnoty rozlíšenia (2,68) a signál/šum. Pre porovnanie validačných parametrov bol pre extrakcie cez SLM ako donor použitý fyziologický roztok s prídavkom bázičných liečiv (1 µg/ml) a 10mM NaOH. Akceptorom bola 10mM HCl, ktorá bola od donoru oddelená 100 µm PP impregnovanou 5µl ENB. Mikroextrakcia bola prevedená po dobu 29 minút a extrahované analyty boli dávkované do kapiláry priamo z povrchu SLM. Výsledný elektroforetický záznam merania je zobrazený na obr. 15-C. Ako reálna matrica bol použitý ľudský moč získaný od dobrovoľníkov z Ústavu analytickej chémie AV ČR, v. v. i. Podmienky extrakcie pre reálnu matricu (ľudský moč) boli totožné ako pri extrakcii z fyziologického roztoku. Výsledný elektroforeogram je zobrazený na obr. 15-D.



Obr. 15: Analýza vzoriek: Podmienky: A-10mM HCl s 1 μ g/ml bázičských liečiv bez zóny octanu amónneho, B-10mM HCl s 1 μ g/ml bázičských liečiv so zónou octanu amónneho, C-extrakcia akceptor-10mM HCl, donor-1 μ g/ml bázičských liečiv v 150 mM NaCl s 10mM NaOH, D-extrakcia akceptor-10mM HCl, donor-1 μ g/ml bázičských liečiv v ľudskej moči s 10mM NaOH. Podmienky: tlak 50mbar, dávkovanie bázičských liečiv (15 s), BGE kys. octová 300 mM, koncentrácia zóny octanu amónneho bola 200 mM. 1-zóna octanu amónneho, 2-nortriptylin, 3-haloperidol, 4-loperamid.

Za vybraných extrakčných podmienok je pre nortriptylin extrakčná výtťažnosť najvyššia ako vo fyziologickom roztoku tak aj v moči cca 75 %. Zatiaľ čo pre loperamid vzhľadom k extrakčnej výtťažnosti pod 10 % sú zvolené extrakčné podmienky nevyhovujúce, čo môže byť spôsobené vyššou molekulovou hmotnosťou a odlišnou hodnotou Log *P*. Prenos analytov z donorového roztoku do akceptorového bol vypočítaný podľa rovnice (5):

$$T = \frac{c_a}{c_d} \cdot 100. \quad (5)$$

kde c_a značí koncentráciu analytov bázičských liečiv obsiahnutých v akceptore, c_d definuje koncentráciu analytov bázičských liečiv obsiahnutých v donore. Výsledky výtťažností extrakcií sú uvedené v tab. 3.

Tab. 3: Porovnanie prenosu bázičských liečiv cez 100 μ m PP SLM.

	Fyziologický roztok	Moč
Nortriptylin	77,8%	73,0%
Haloperidol	66,1%	70,5%
Loperamid	2,6%	9,4%

8 Záver

Cieľom práce bola priama analýza biologických vzoriek v spojení s SLM extrakciou a CE. Zvýšenie citlivosti on-line prekoncepcie pomocou tITP. Optimalizácie prebiehali spočiatku v 10mM HCl. Neskôr optimalizácia mikroextrakcie prebiehala vo fyziologickom roztoku, ktorý simuloval podmienky reálnej matrice. Po overení stability predchádzajúcich systémov bol ako matrica použitý neriedený ľudský moč. Pre dosiahnutie čo najvyššieho zakoncentrovania analytov základných liečiv bol experimentálne nastavený najlepší čas hydrodynamického dávkovania zóny octanu amónneho a to na 15 s a dávkovanie analytov základných liečiv prebiehalo pri 15 s. Zvýšenie a urýchlenie extrakčnej výťažnosti mikroextrakcie bolo zabezpečené zalkalizovaním donoru pomocou 10mM hydroxidu sodného a okyslením akceptora 10mM kyselinou chlorovodíkovou. Čas, kedy sa výťažnosť mikroextrakcie nemenila bol stanovený na 29 minút. Toto prepojenie zabezpečuje jednoduchú a lacnú alternatívu k drahším analytickým systémom. Mikroextrakčná jednotka nepresahuje cenu jednej koruny českej za jeden kus. Vďaka automatizácii celého systému sa táto kombinácia techník dá využiť pri analýze jednotlivých liečiv z neriedeného moču. Optimalizácia by mohla byť rozšírená na analýzu krvi, alebo odpadovej vody. Citlivosť celej metódy SLM-CE nemusí byť pri niektorých aplikáciách dostatočná. Pre takéto prípady je možnosť využiť kombinácie techník (SLM-CE-MS), alebo použiť jednu z ďalších on-line prekoncepcných techník ako napríklad izotachofóru.

9 Použitá literatura

- [1] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-647-6.
- [2] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [3] TEKEĽ, Jozef a Mikuš PETER. *Vybrané kapitoly z analytickej chémie: analýza látok v biologických systémoch*. Bratislava: Univerzita Komenského, 2005. ISBN 80-223-1988-0.
- [4] VOLKA, Karel. *Analytická chémie II*. Praha: VŠCHT Praha, 1997. ISBN 978-80-7080-227-4.
- [5] MITRA, Somenath. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003. ISBN 9780471328452.
- [6] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. Český Těšín: 2 THETA, 2014. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [7] ARTHUR, Catherine L. a Janusz PAWLISZYN. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. 1990, 62(19), 2145–2148. DOI: 10.1021/ac00218a019. ISBN 10.1021/ac00218a019.
- [8] RISTICEVIC, Sanja, Vadoud H. NIRI, Dajana VUCKOVIC a Janusz PAWLISZYN. Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 393(3), 781-795. DOI: 10.1007/s00216-008-2375-3. ISSN 1618-2642.
- [9] HAGAROVÁ, Ingrid. Extractions Complying With the Principles of Green Chemistry Used in Trace Analysis of Metals. *Chemické Listy*. 2014, 109(4), 269-275. ISSN 1213-7103.
- [10] ALTUN, Zeki, Mohamed ABDEL-REHIM a Lars BLOMBERG. New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications: Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS–LC–MS–MS. *Journal of Chromatography B*. 2004, 813(1), 29-135. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.09.020.
- [11] LORD, Heather L., Weiqiang ZHAN a Janusz PAWLISZYN. Fundamentals and applications of needle trap devices. *Analytica Chimica Acta*. 2010, 677(1), 3-18. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.020.
- [12] JEANNOT, Michael A. a Frederick F. CANTWELL. Solvent Microextraction into a Single Drop. *Analytical Chemistry*. 1996, 68(1), 2236–2240. DOI: 10.1021/ac960042z.
- [13] ALOTHMAN, Zeid A., Mohamed DAWOD, Jihye KIM a Doo Soo CHUNG. Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2012, 739(1), 14-24. DOI: 10.1016/j.aca.2012.06.005.

- [14] TONG, Fanghong, Yang ZHANG, Fang CHEN, et al. Hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for trace analysis of sulfonamide compounds. *Journal of Chromatography B*. 2013, 942-943(1), 134-140. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.10.038.
- [15] DING, Qiang, Pei LIANG, Feng SONG a Amining XIANA. Separation and Preconcentration of Silver Ion using Multiwalled Carbon Nanotubes as Solid Phase Extraction Sorbent. *Separation Science and Technology*. 2006, 41(12), 2723–2732. DOI: 10.1080/01496390600725844.
- [16] JONSSON, Jan Ake a Lennart MATHIASSEN. Membrane-based techniques for sample enrichment. *Journal of Chromatography A*. 2000, 902(1), 205–225. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00922-5.
- [17] KUBÁŇ, Pavel a Petr BOČEK. Direct coupling of supported liquid membranes to capillary electrophoresis for analysis of complex samples: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 2013, 787, 10-23. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.065. ISSN 00032670.
- [18] GJELSTAD, Astrid a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Recent developments in electromembrane extraction. *Analytical Methods*. 2013, 5(18), 4549-4557. DOI: 10.1039/C3AY40547H. ISSN 1759-9660.
- [19] JÖNSSON, Jan Åke a Lennart MATHIASSEN. Membrane Extraction for Sample Preparation. *Sample preparation perspectives*. 2003, 21(5), 424–538. ISSN: 1527-5949.
- [20] JÖNSSON, Jan Ake a Lennart MATHIASSEN. Membrane Extraction Techniques in Bioanalysis. *Chromatographia Supplement*. 2000, 52(1), S8-S11. ISSN: 0009-5893.
- [21] UR REHMAN, Hanif, Gul AKHTAR, Haroon UR RASHID, Nauman ALI, Imtiaz AHMAD, Saeed UR REHMAN, Kamin KHAN a Muhammad ARSHAD. Transport of Zn (II) by TDDA-Polypropylene Supported Liquid Membranes and Recovery from Waste Discharge Liquor of Galvanizing Plant of Zn (II). *Journal of Chemistry*. 2017, 2017, 1- 9. DOI: 10.1155/2017/7569354. ISSN 2090-9063.
- [22] XUE, Juan Qin, Ni Na LIU, Guo Ping LI a Long Tao DANG. Characterization of a supported ionic liquid membrane used for the removal of cyanide from wastewater. *Water Science and Technology*. 2017, 76(11), 3142-3149. DOI: 10.2166/wst.2017.443. ISSN 0273-1223.
- [23] TISELIUS, Arne. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society*. 1937, 33(1), 524–531. DOI: 10.1039/tf9373300524.
- [24] JANDIK, Petr. a Günther. BONN. *Capillary electrophoresis of small molecules and ions*. New York, NY: VCH, c1993. ISBN 15-608-1533-7.
- [25] RIGHETTI, Pier a Günther BONN. *Capillary electrophoresis in analytical biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, c1996. ISBN 08-493-7825-7.
- [26] GROSSMAN, Paul D. a Joel C. COLBURN. *Capillary electrophoresis*. San Diego: Academic Press, c1992. ISBN 01-230-4250-X.

- [27] HJERTÉN, Stellan. Free zone electrophoresis. *Chromatographic Reviews*. 1967, 9(2), 122-143. DOI: 10.1016/0009-5907(67)80003-6.
- [28] KAŠIČKA, Václav. Teoretické Základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické Listy*. 1997, 91(5), 320-329. ISSN 0009-2770.
- [29] JORGENSON, James W. a KRYNN D. LUKACS. Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clinical Chemistry*. 1981, 27(9), 1551-1553. ISSN: 0009-9147.
- [30] PÁLMARSDÓTTIR, Sveinbjörg, Lennart MATHIASSEN, Jan A. JÖNSSON a L.E. EDHOLM. Micro-CLC as an interface between SLM extraction and CZE for enhancement of sensitivity and selectivity in bioanalysis of drugs. *Journal of capillary electrophoresis*. 1996, 3(5), 255–260. ISSN: 10795383.
- [31] MERBEL, Nico van de. Membrane-based sample preparation coupled on-line to chromatography or electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1999, 856(1), 55-82. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00581-6.
- [32] HORÁKOVÁ, Jana, Vítězslav MAIER a Juraj ŠEVČÍK. On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze. *Chemické Listy*. 2006, 100(3), 163–168. ISSN: 00092770.
- [33] KARTSOVA, Liudmila a Elena BESSONOVA. Preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry*. 2009, 64(4), 326–337. DOI: 10.1134/S1061934809040029. ISSN: 1061-9348.
- [34] HJERTEN, Stellan, Sture JERSTEDT a Arne TISELIUS. Some aspects of the use of "continuous" and "discontinuous" buffer systems in polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 1965, 11(2), 219-223. DOI: 10.1016/0003-2697(65)90008-4. ISSN 00032697.
- [35] QUIRINO, Joselito P. a Shigeru TERABE. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2000, 902(1), 119–135. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00812-8.
- [36] LIN, Cheng-Huang a Takashi KANETA. On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules. *Electrophoresis*. 2004, 25(1), 4058–4073. DOI: 10.1002/elps.200406172.
- [37] PANTUČKOVÁ, Pavla, Pavel KUBÁŇ a Petr BOČEK. Sensitivity enhancement in direct coupling of supported liquid membrane extractions to capillary electrophoresis by means of transient isotachophoresis and large electrokinetic injections. *Journal of Chromatography A*. 2015, 1389(1), 1–7. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.026.
- [38] BRITZ-MCKIBBIN, Philip a Shigeru TERABE. On-line preconcentration strategies for trace analysis of metabolites by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2003, 1000(1), 917–934. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00502-8.
- [39] PETR, Ján, Vítězslav MAIER, Joanna ZNALEZIONA, Juraj ŠEVČÍK, Kateřina VÍTKOVÁ a Václav RANC. On-line preconcentration on pH boundary - The beauty of capillary electrophoresis. *Chemické listy*. 2009, 103(8), 661-666. ISSN: 00092770.

- [40] WANG, Chun, Cairui LI, Xiaohuan ZANG, Dandan HAN, Zhimei LIU a Zhi WANG. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction combined with on-line sweeping for trace analysis of Strychnos alkaloids in urine by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1143(1), 270–275. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.027.
- [41] SIMPSON, Steven L., Joselito P. QUIRINO a Shigeru TERABE. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1184(1), 504–541. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.11.001.
- [42] PERUZZO, Pablo J., D. J. G. MARINO, Eduardo A. CASTRO a Andrey A. TOROPOV. QSPR Modeling of Lipophilicity by Means of Correlation Weights of Local Graph Invariants. *Internet Electronic Journal of Molecular Design*. 2003, 334–347. ISSN 1538-6414.
- [43] ŠEVČÍK, Jiří Georg Kamil. *Metodologie měření v analytické chemii*. Praha, 1996. ISBN 80-718-4271-0.
- [44] SERJEANT, E.P a Boyd DEMPSEY. *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*. New York: Pergamon Press, 1979. ISBN 978-0080223391.
- [45] RYŠAVÁ, Lenka, Miloš DVOŘÁK a Pavel KUBÁŇ. The effect of membrane thickness on supported liquid membrane extractions in-line coupled to capillary electrophoresis for analyses of complex samples. *Journal of Chromatography A*. 2019. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.02.067. ISSN 00219673.

10 Zoznam použitých symbolov a skratiek

BGE	základný elektrolyt
CE	kapilárna elektroforéza
CZE	kapilárna zónová elektroforéza
DAD	detektor s diódovým polom
ENB	1-ethyl-2-nitrobenzen
EOF	elektroosmotický tok
LIF	laserom indukovaná fluorescencia
LLE	extrakcia kvapalina-kvapalina
LOD	limit detekcie
LOQ	medz stanoviteľnosti
MEKC	micelárna elektrokinetická chromatografia
MS	hmotnostná spektrometria
PP	polypropylén
PTFE	polytetraflourethylen
RSD	relatívne smerodajná odchýlka
SLM	kvapalná fáza na pevnom nosiči
tITP	transientná isotachoforéza
UV	ultrafialové žiarenie
VIS	viditeľné žiarenie